

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE AGRONOMÍA

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO



PRODUCCION DE BIOGAS E IDENTIFICACION DE
BACTERIAS METANOGENICAS EN LODOS
DE AGUAS RESIDUALES INDUSTRIALES

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA
PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS AGRICOLAS

POR

M.C. MANUELA BOLIVAR DUARTE

MARIN, N. L., MEXICO

SEPTIEMBRE, 2004

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE AGRONOMIA

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO



**PRODUCCION DE BIOGAS E IDENTIFICACION DE
BACTERIAS METANOGENICAS EN LODOS
DE AGUAS RESIDUALES INDUSTRIALES**

TESIS

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA
PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS AGRICOLAS**

POR

M.C. MANUELA BOLIVAR DUARTE

MARIN, N. L., MEXICO

SEPTIEMBRE, 2004

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE AGRONOMÍA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO**



**PRODUCCIÓN DE BIOGAS E IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS
METANOGÉNICAS EN LODOS DE AGUAS RESIDUALES INDUSTRIALES**

T E S I S

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS AGRÍCOLAS**

P o r

M.C. MANUELA BOLÍVAR DUARTE

COMISIÓN DE EXAMEN

**Dr. Juan Francisco Plissani Zúñiga
Presidente**

**Dr. Omar Guadalupe Alvarado Gómez
Secretario**

**PhD. Emilio Olivares Sáenz
Vocal**

**PhD. Uriel Figueroa Viramontes
Vocal**

**PhD. Rigoberto E. Vázquez Alvarado
Vocal**

Marín, N.L., México

Septiembre, 2004

CONTENIDO

	Pág.
Dedicatoria	v
Agradecimientos	vi
Semblanza de la Autora	vii
Lista de Cuadros	viii
Lista de Figuras	ix
 RESUMEN	 xi
ABSTRACT	xii
 I. INTRODUCCIÓN	
1.1 Hipótesis	4
1.2 Objetivos	4
 II. REVISIÓN DE LITERATURA	
2.1 Digestión Aeróbica	5
2.2 Digestión Anaeróbica	6
2.3 Ventajas y Desventajas	6
2.4 Descripción del Proceso Anaeróbico	8
2.4.1 Tipos de Digestores	8
2.4.2 Etapas de la Digestión Anaeróbica	9
2.5 Factores del Medio Ambiente	14
2.5.1 Sustrato	14
2.5.2 pH	15
2.5.3 Alcalinidad	15
2.5.4 Nutrientes	16
2.5.5 Toxicidad	21
2.5.6 Temperatura	27
2.5.7 Mezclado	31
2.6 Microbiología de la Digestión Anaeróbica	33
2.6.1 Aspectos Generales	33
2.6.2 Bacterias Formadoras de Ácidos	34
2.6.3 Bacterias Acetógenas Productoras Obligadas de Hidrógeno (OPHA).	34
2.6.4 Bacterias Acetógenas	35
2.6.5 Bacterias Metanógenas	35
2.7 Taxonomía de Archaea	38
2.8 La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).	42
2.8.1 Etapas de la PCR.	44
2.8.2 Componentes requeridos	45
2.8.3 Aplicaciones de la PCR	47

III.	MATERIALES Y MÉTODOS	
3.1	Etapas de Investigación	50
3.1.1	Estandarización del método de pruebas Metanogénicas	50
3.1.2	Detección de Bacterias Metanogénicas	60
IV.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
4.1	Calibración y Estandarización de las Pruebas Metanogénicas	67
4.1.1	Volumen de biogas producido	67
4.1.2	Calidad del Biogas	70
4.1.3	Calidad del Lodo	70
4.2	Detección de Bacterias Metanogénicas	70
V.	CONCLUSIONES	75
VI.	LITERATURA CITADA	77
VII.	APENDICE	82

DEDICATORIA

*A mis papás: Tomy y Lelo
que con su ejemplo de
dedicación, tenacidad y amor
al trabajo, contagiaron mis
deseos por aprender y
superarme siempre.*

*A mis hijos: Adrián
Emmanuel, Melany y
Jesús Alejandro, fuente
inagotable de energía y
vitalidad.*

*A Myrna y José
Luis por su amistad y
disposición de caminar
juntos, gracias.*

AGRADECIMIENTOS

Al Conacyt y ANUIES; fuentes becarios, gracias por todo el apoyo recibido durante parte de mi estancia en este doctorado.

A la UAAAN, que fue parte muy importante en mi decisión de realizar este postgrado, gracias a todos y cada uno de ustedes.

A la Foc de Agronomía de la UANL, en donde encontré gente entusiasta y decidida que hizo mi estancia muy agradable.

Al personal y funcionarios de Agua y Drenaje de Monterrey y sus plantas tratadoras, porque en ellos encontré un sinnúmero de opciones o seguir y siempre un soporte técnico, gracias de verdad.

Al Dr. Juan Francisco Pissoni Z., quien con su constante insistencia y refuerzo me llevó a feliz término, con este compromiso personal, todo mi reconocimiento por usted.

Al Dr. Omar Guadalupe Alvarado Gómez, su insistencia y constancia hacia mi tesis fue un acicate para terminar este trabajo, gracias por su objetiva participación.

Al Dr. Emilio Olivares S., de usted recibí un refuerzo y asistencia no sólo en los aspectos académicos de este trabajo, fue un privilegio por mí, de antemano, gracias.

Al Dr. Uriel Figueroa Viromontes, recibir su asesoría y el permitirme compartir parte de sus conocimientos, es invaluable, gracias.

Al Dr. Rigoberto E. Vázquez Alvarado, por su disponibilidad por colaborar en este proyecto y haber aceptado formar parte del comité de mi tesis.

A Porfirio Cortez, Roberto Rodríguez, Ing. Jorge Bemol y Don Juanito Lozano, sin su apreciable ayuda, consejos y colaboración, no habría sido posible la culminación de este trabajo.

Al Personal de la Subdirección de Postgrado de la Fac. de Agronomía, gracias por ese apoyo, por esa cara amable siempre, esa sonrisa franca y su amistad invaluable.

A mis compañeros de Doctorado, especialmente a Woo y Juanita, por compartir este tramo del camino.

SEMBLANZA DE LA AUTORA

Bajo el lema de 'La apatía sólo puede ser vencida por el entusiasmo' Manuela Bolívar Duarte, nativa de Guanaceví, Durango, ganó del premio como 'Mejor Estudiante de México' en 1980, cursando la carrera de Ingeniero Agrónomo en Suelos e Irrigación en la Escuela Superior de Agricultura Hermanos Escobar de Cd. Juárez, Chihuahua.

Posteriormente obtiene una beca para realizar la Maestría en Suelos y decide cursarla en la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro ubicada en Saltillo, Coahuila, habiendo obtenido su grado, ingresa como Profesor Investigador adscrito al Departamento de Riego y Drenaje impartiendo clases a nivel Licenciatura y Postgrado en la Academia de Rehabilitación de Suelos, siendo así mismo asesora de diferentes tesis en ambos niveles.

Inicia en Agosto de 1997 el Doctorado en Ciencias Agrícolas en la Facultad de Agronomía de la Universidad Autónoma de Nuevo León, presentando su Disertación Doctoral en el 2002.

LISTA DE CUADROS

No.	Descripción	Página
1	Ventajas y desventajas de los métodos de tratamiento aeróbico y anaeróbico de lodos	7
2	Composición elemental de las bacterias metanógenas.	19
3	Efecto del nitrógeno amoniacal en la digestión anaeróbica	22
4	Concentraciones estimulantes e inhibitorias de cationes metálicos ligeros	22
5	Concentraciones totales de metales individuales requeridas para inhibir seriamente la digestión anaeróbica (Cydsa-Atlatic, 1995)	25
6	Combinaciones antagónicas y sinérgicas de cationes (WEF, 1996)	26
7	Características del proceso de digestión anaerobia, de acuerdo al intervalo de temperatura en que se efectúa la Metanogénesis (IMTA, 1993)	30
8	Solución de elementos traza utilizada en las pruebas metanogénicas.	53
9	Solución nutritiva utilizada en las pruebas metanogénicas.	53
10	Caracterización de los lodos utilizados en la metanogénesis a diferentes temperaturas.	54
11	Análisis de Varianza (ANVA) de la repetición II. Pruebas de efectos entre variables.	69
12	Volumen acumulado de biogas producido (I) y eficiencia de las pruebas metanogénicas (g.DQO.d) por Tratamiento	69

LISTA DE FIGURAS

No.	Descripción	Página
1	Digestor de alta carga	8
2	Digestor de baja carga	9
3	Etapas de la metanogénesis en la digestión	10
4	Relación entre el pH y la concentración del bicarbonato a 35°C	17
5	Efecto de la Temperatura sobre la producción de gas	29
6	Ciclo básico del carbono en el ambiente	38
7	El Reino <i>Euryarchaeota</i> . El dendograma muestra organismos representativos de los cuatro grupos principales: metanógenos (verde), halobacterias (púrpura), thermoplasmas (naranja) y termococos (rosa). Prescott <i>et al.</i> (2000).	41
8	Localización de la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales Dulces Nombres.	50
9	Digestores de la PTAR Dulces Nombres	51
10	Esquematzación de la prueba metanogénica	52
11	Pruebas metanogénicas de los diferentes tratamientos	57
12	Sensor de medición de la concentración de H ₂ S (0.25-2.5 ppm)	58
13	Medición del H ₂ S contenido en el biogas.	58
14	Cuantificación del NMP	60

15	Digestión anaeróbica de lodo primario a 57° C .	61
16	Vista del termociclador Blorad utilizado para la amplificación del ADN bacteriano.	65
17	Cámara de Electroforesis (Gibco BRL, modelo Horizon 58) utilizada para la separación de productos de PCR.	66
18	Simulación de amplificación por PCR del gen ARNr 16S a partir de la secuencia AF0228690 de <i>Methanobacterium</i> sp. y los primers Mbac-izq y Mbac-der.	71
19	Simulación de amplificación por PCR del gen mrc (metil CoM reductasa) a partir de la secuencia de <i>M. Thermoautotrophicum</i> y los primers ME1 y ME 2.	72
20	Amplificación enzimática de los genes ARNr 16S (carril 1) y la subunidad α del gen de la coenzima metil reductasa M (carril 2) de bacterias metanogénicas presentes en lodos de una planta de tratamiento de aguas residuales. m es el marcador de peso molecular escalera 100 y las flechas indican los productos obtenidos de 310 y 762 pb aproximadamente.	74

RESUMEN

Manuela Bolívar Duarte

Fecha de Graduación: Agosto, 2004.

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Agronomía

Título del Estudio: Producción del biogas e identificación de bacterias metanogénicas en lodos de la planta de Tratamiento de Aguas Residuales Dulces Nombres en el Municipio de Pesquería, N.L.

Número de páginas: 97

**Candidato al grado de Doctor en Ciencias
Agrícolas con especialidad en Agua-Suelo.**

Area de Estudio: Agua-Suelo (Tratamiento y reutilización de aguas residuales y digestión anaeróbica).

Propósitos y Método de Estudio: El tratamiento de aguas residuales es indispensable para evitar problemas al ambiente y a la salud. Este proceso tiene como producto grandes volúmenes de lodo líquido, deshidratado, contaminantes y patógenos provenientes de las actividades humanas que pueden ser disminuidos o eliminados mediante la digestión anaeróbica donde la materia orgánica (MO) existente en los lodos primarios y secundarios es transformada, por acción de microorganismos, en metano (CH_4), sulfuro de hidrógeno (H_2S), el volumen producido a 36° , 40° , 50° y 60°C , repitiéndose cada tratamiento tres veces y su evaluación se hizo utilizando el Análisis de Varianza (ANVA) con un modelo de dos factores sin interacción y finalmente la detección de las bacterias metanogénicas presentes en el digestor variando el método de extracción del ADN y haciendo uso de la aplicación de la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Contribuciones y Conclusiones: Se logró la calibración y estandarización del método de las pruebas metanogénicas que una vez utilizadas en los diferentes tratamientos se observó que a 36°C se produce la mayor cantidad de biogas, sin modificarse la calidad. En cuanto a la extracción del ADN el método modificado de De Lamballerie resultó ser el más efectivo, para la identificación de especies metanogénicas, la técnica de PCR es rápida, precisa y no requiere de aislamientos anaeróbicos en condiciones específicas.

FIRMA DEL ASESOR PRINCIPAL:

ABSTRACT

Manuela Bolivar Duarte

Date of Graduation: August, 2004.

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Agronomía

Title of Dissertation: Biogas production and methanogenic bacteria identification in sewage sludge of Dulces Nombres sewage water treatment plant in Pesqueria Municipality, N. L.

Number of pages: 97

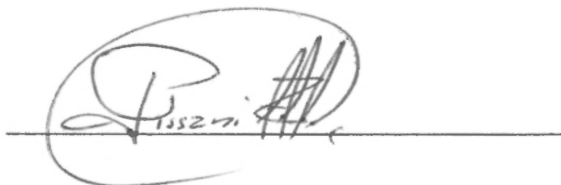
Candidate to the degree of Doctor in Agricultural Sciences with emphasis in soil and water

Area of study: water and soil (treatment and reuse of sewage water and anaerobic digestion)

Objectives and methodology: sewage water treatment is indispensable to avoid environment pollution and health risks. The side product of this process is a huge volume of dehydrated sewage sludge, containing pathogens and contaminants coming from human activities. Pathogens and some contaminants may be reduced or eliminated through anaerobic digestion; in this process the existing organic matter (OM) in primary and secondary sludge is transformed by microorganisms in methane (CH_4) and hydrogen sulfur (H_2S). Analysis of variance of volume produced at 36°, 40°, 50° and 60° C with three replications was done as a bi-factorial experiment with no interaction. Finally, detection of methanogenic bacteria from the digester was done changing the DNA extraction method and using the polymerase chain reaction (PCR) technique.

Contributions and conclusions. The method of methanogenic test was calibrated and standardized. When used in different treatments, the biggest amount of biogas was observed at 36° C, with no change in quality. Respect to DNA extraction, the modified method of Lamballerie was the most effective to identify methanogenic bacteria. PCR technique is fast and precise, with no requirements anaerobic isolates in specific conditions.

SIGNATURE OF MAIN ADVISOR:



Uno de los procesos de tratamiento del agua residual es el biológico, teniendo las digestiones aeróbica y anaeróbica como formas de estabilización de la materia orgánica y de los sólidos biológicos, así como la eliminación de sólidos no sedimentables y reducción de patógenos.

Antecedentes muestran que la producción de metano se incrementó conforme lo hace la temperatura, logrando además la destrucción de patógenos como lo muestra Plachy *et al.* (1997) en trabajos donde se comparó el efecto de las digestiones mesófila (36°C) y termófila (54°C) sobre *Ascaris suum*, resultando más efectiva esta última.

El dominio *Archaea* metanogénicas representan el único grupo de microorganismos con la capacidad de producir metano a partir de pocos sustratos. En ambientes anaeróbicos, las bacterias metanogénicas son el enlace final de la cadena alimenticia y juegan un papel importante en la comunidad microbiana de muchos ambientes naturales y hechos por el hombre (Daffonchio *et al.*, 1998).

Debido a lo enorme cantidad de desechos tóxicos y sus problemas consecuentes, en México, al igual que en otras partes del mundo, se han establecido plantas de tratamiento de aguas residuales con el propósito

de reciclar su uso con fines agrícola e industrial. Este tratamiento implica todo un proceso en donde la parte final la desarrollan bacterias productoras de metano quienes realizan una digestión anaeróbica, que entre otras cosas permite la estabilización de los lodos. A pesar de la importancia de este último paso, poco se sabe en México sobre el ecosistema microbiano involucrado y menos aún sobre la diversidad de especies y cepas.

Reeve (1992) señaló que se han descrito más de 50 especies de bacterias metanogénicas pertenecientes a 19 géneros. La identificación de aislamientos metanogénicos es difícil ya que, las descripciones de especies no son necesariamente representativas, además los nuevos aislamientos pueden representar especies no descritas anteriormente y debido a la gran diversidad genética las características fenotípicas frecuentemente son insuficientes para identificación ya que los métodos fisiológicos tradicionales no son suficientemente discriminativos debido al limitado número de sustratos usados para las bacterias metanogénicas.

El desarrollo de métodos basados en la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para detectar parte del genoma de las

bacterias puede ser de ayuda práctica para la identificación de especies metanogénicas y sus cepas.

1.1. Hipótesis:

- i) La Demanda Química de Oxígeno (DQO) removida es un reflejo de la actividad metanogénica, por lo tanto, es necesario desarrollar una metodología para cuantificar esta relación.
- ii) La cantidad de biogas y su contenido de sulfuro de hidrógeno (H_2S) son afectados por la temperatura, por lo que deben evitarse fluctuaciones de la misma.
- iii) Es posible implementar la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para la identificación de bacterias metanogénicas, en un digestor anaeróbico.

1.2. Objetivos:

- i) Adaptar una metodología para cuantificar la actividad metanogénica reflejada por la DQO removida.
- ii) Determinar el volumen y el contenido de H_2S del biogas producido a diferentes temperaturas.
- iii) Detectar la presencia de bacterias metanogénicas en un digestor anaeróbico mediante la aplicación de la técnica reacción en cadena de la polimerasa.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

En el pasado, la evacuación de las aguas residuales se llevaba a cabo sin considerar la acumulación de lodo y los malos olores que éstas causaban a los habitantes de los lugares donde se depositaban. Para resolver el problema se implementó el tratamiento de agua mediante diversos procesos. El biológico es uno de ellos y tiene como objetivos la estabilización de la materia orgánica (M.O.), eliminación de sólidos no sedimentables y de patógenos a través de digestión aeróbica y anaeróbica.

2.1 Digestión Aeróbica

Es la estabilización del lodo por medio de microorganismos en presencia de oxígeno disuelto. Esta oxidación bioquímica puede llevarse en tanques abiertos o cerrados (Torres y Zárate, 1996). Gamrasni (1985) menciona que en ocasiones se mezclan los lodos primarios con un exceso de lodos activados; esta mezcla tiende a la fermentación y para evitar malos olores se hace pasar aire proveniente de una turbina, aire comprimido o con oxígeno puro. Durante este proceso se observa una mineralización de la M.O. teniendo como productos finales gas

carbónico, agua y nitrato. Este procedimiento consume energía eléctrica y no permite la eliminación de algunos parásitos.

2.2 Digestión Anaeróbica

Es la degradación biológica de sustancias orgánicas complejas en ausencia de oxígeno libre. Durante el desarrollo de estas reacciones la M.O. se convierte en metano (CH_4), bióxido de carbono (CO_2), sulfuro de hidrógeno (H_2S) agua y liberación de energía (Torres y Zárate, 1996). A estos compuestos juntos, se les conoce, según Gamcasni (1985) como biogas o bioenergías, por ser un gas combustible. Este procedimiento goza en la actualidad de gran importancia, a pesar de que es una de las formas de tratamiento biológico del agua residual más antigua (1850) y el más extendido como lo mencionan Metcalf & Eddy (1997). El proceso termina con el desprendimiento del metano, producto altamente insoluble.

2.3 Ventajas y Desventajas

En el Cuadro 1 se muestran las ventajas y desventajas de los métodos de tratamiento aeróbico y anaeróbico de lodos, según lo mencionan IMTA (1993) y Torres y Zárate (1996). Además de las diferencias anteriores mencionan otra importante como es que una

bacteria anaeróbica utiliza el 10 por ciento de la energía contenida en su alimento o sustrato para funciones de reproducción y el 90 por ciento restante, para la producción de gas metano. La bacteria aeróbica emplea, en presencia de oxígeno, de un 60 a 65 por ciento de la energía del sustrato en la síntesis de nuevas células y la fracción restante se disipará en forma de calor.

Cuadro 1. Ventajas y desventajas de los métodos de tratamiento anaeróbico y aeróbico de lodos. IMTA (1993) y Torres y Zárate (1996).

PROCESO	VENTAJAS	DESVENTAJAS
ANAERÓBICO		" Lento crecimiento de bacterias metanogénicas
		" Lentitud en el arranque
	" Menor producción de lodo biológico	" Adaptación lenta de variaciones en la alimentación
	" Posibilidad de tratar desechos con alto contenido de materia orgánica	" Dificultad en su control
	" Utilización del metano para producir energía	" Productos reducidos en el efluente (requiere un post-tratamiento)
	" Periodos prolongados sin alimentación	" Complejidad en el sistema de distribución
	" El lodo biológico en el rango termofilico	" Dificultad en la construcción si son profundos
AERÓBICO		" El agua resultante contiene una alta cantidad de amonio
		" Mayor tiempo de retención
		" Requiere aireación
	" Alta eficiencia en la remoción de materia orgánica	" Produce diez veces más lodo biológico
	" Son procesos relativamente estables	" Inadecuado para tratar residuos líquidos con altos contenidos de materia orgánica
		" No soporta periodos largos sin alimentación

2.4 Descripción del Proceso Anaeróbico

La digestión anaeróbica es uno de los procesos más antiguos utilizados en la estabilización de los lodos, teniendo como características un bajo contenido de materia orgánica y patógenos además de que no es putrescible.

2.4.1. Tipos de Digestores. Los anaerobios más utilizados según Metcalf & Eddy (1997) son:

- **De alta carga.** En este proceso el contenido del digestor se calienta y mezcla continuamente (Figura 1). El tiempo de detención normalmente es de un máximo de 15 días.

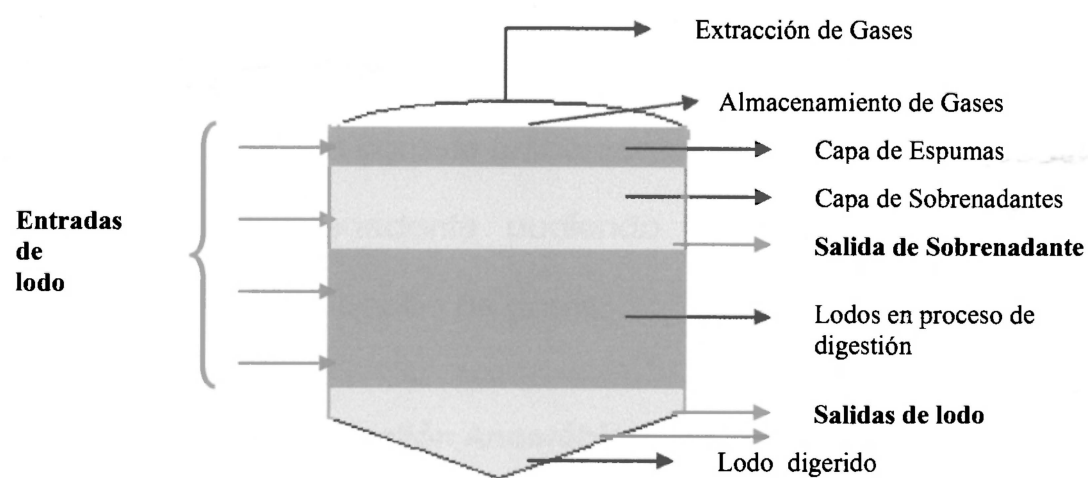


Figura 1. Digestor de alta carga

- **De baja carga.** En este proceso el contenido del digestor no se calienta ni mezcla, contrario al anterior, caracterizándose por sus tiempos de digestión que varían entre 30 y 60 días (Figura 2).

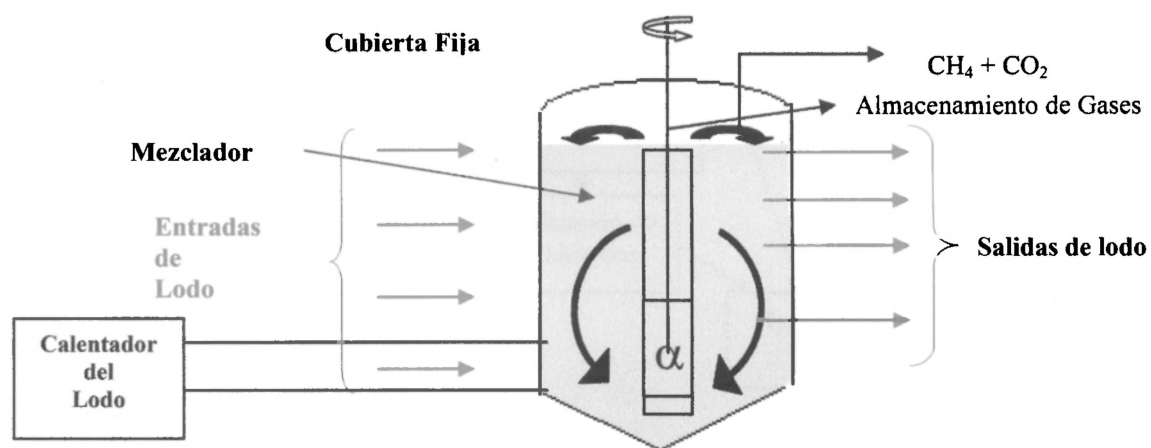


Figura 2. Digestor de baja carga

- **Proceso de doble etapa.** Es la combinación de los dos procesos anteriores. La segunda etapa consiste fundamentalmente en separar los sólidos digeridos del sobrenadante pudiendo existir una digestión adicional y por lo tanto, producción de gases.

2.4.2 Etapas de la Digestión Anaeróbica

La mineralización de la M.O. en suspensión por un sistema microbiológico mixto en condiciones anaerobias, se lleva a cabo en tres etapas como lo describe la Figura 3, Water Environment Federation (WEF, 1996).

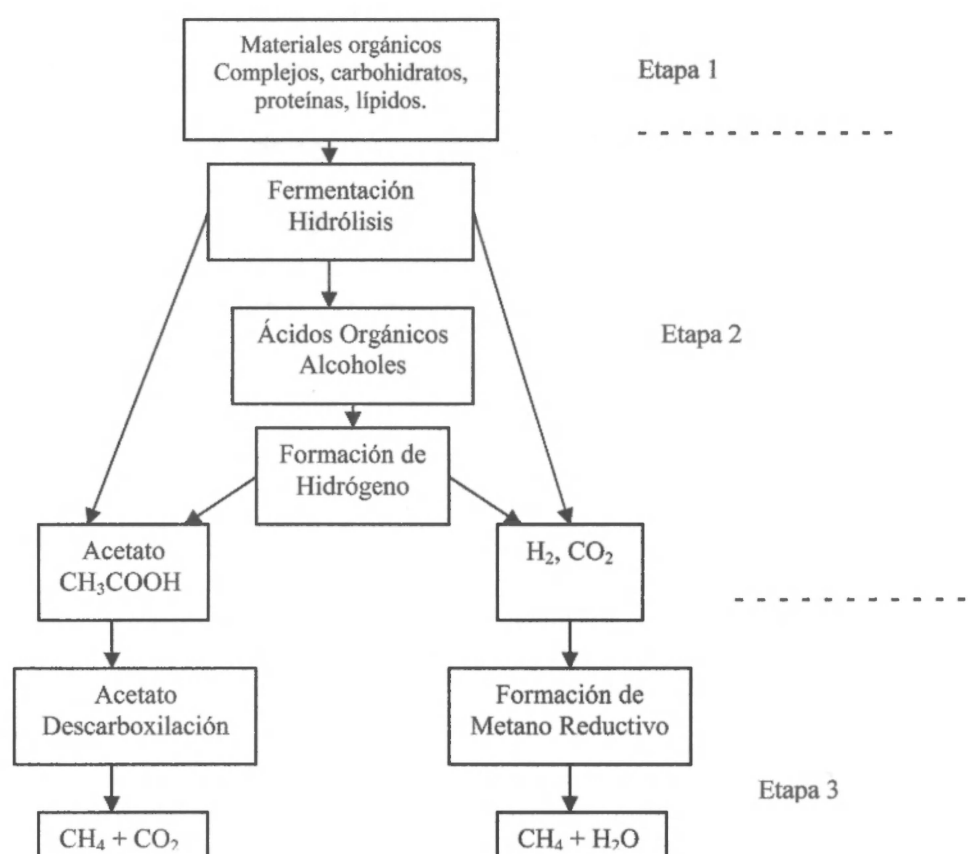
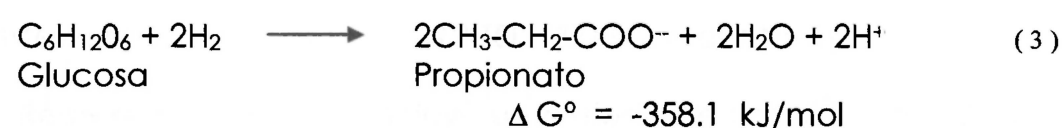
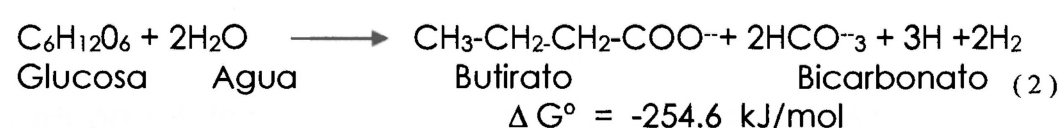
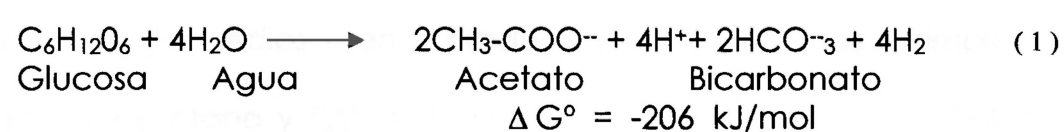


Figura 3. Etapas de la metanogénesis en la digestión anaeróbica (WEF, 1996)

- **Hidrólisis y Fermentación.** En la Figura 3 se muestra que en la primera etapa del proceso los compuestos de alto peso molecular como carbohidratos, proteínas y lípidos, son hidrolizados y transformados en compuestos de bajo peso molecular (Metcalf & Eddy, 1997), debido a que las bacterias son incapaces de alimentarse de material orgánico particulado el material debe romperse por vía enzimática (IMTA, 1993), hasta transformarse en

azúcares y aminoácidos; éstos serán fermentados para producir acetato, CO₂, Hidrógeno, ácidos grasos volátiles (AGV's) como son acético, propiónico, butírico, iso-butírico e iso-valérico, como lo muestran las siguientes reacciones:



Donde:

ΔG° = Energía libre de formación (o de Gibbs) a 25°C, y 1 atmósfera de presión. El signo negativo indica liberación de energía en la reacción.

Estas reacciones son muy rápidas por lo que una sobrecarga orgánica produce un exceso de AGV's que acidifican el sistema.

➤ **Acetogénesis.** Durante esta etapa se produce ácido acético mediante la oxidación anaeróbica de ácidos grasos de cadena larga y de ácidos grasos volátiles (AGV's), productos de la fermentación que son convertidos en acetato, hidrógeno y dióxido de carbono por un grupo de bacterias conocidas como OHPA (bacterias acetógenas productoras obligadas de hidrógeno). Estos tienen una relación sintrófica con las metanogénicas que utilizan

hidrógeno (metanógenas, hidrogenófilas-MH) producido en la oxidación anaerobia para producir el CO₂ que proviene de la fermentación.

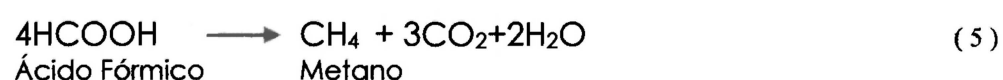
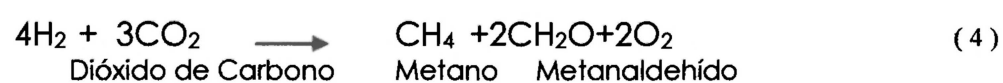
➤ **Metanogénesis.** Supone la conversión bacteriana de los compuestos intermedios en productos finales más simples, principalmente metano y CO₂ (Holland *et al.*, 1987 y Mc Carty, 1964 y 1966).

La etapa de fermentación de metano se efectúa según Water and Wastewater Training Division (WWTD, 2000), en dos fases:

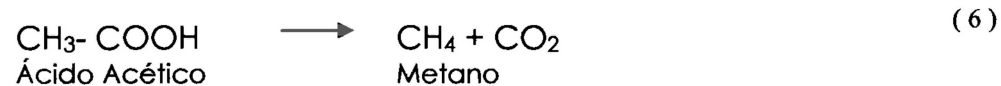
➤ **Regresión ácida**, que incluye un periodo de transición donde la producción de amoníaco neutraliza la producción de ácido y el pH inicia su ascenso.

➤ **Etapa Alcalina**, en esta parte del proceso ocurre la estabilización con la producción de metano, debiendo ser del 65-70 por ciento normalmente. El CO₂ se forma durante todas las etapas estando presente en concentraciones que varían del 15 al 30 por ciento. La generación del metano se lleva a cabo por dos vías, como lo hacen notar Metcalf y Eddy (1997):

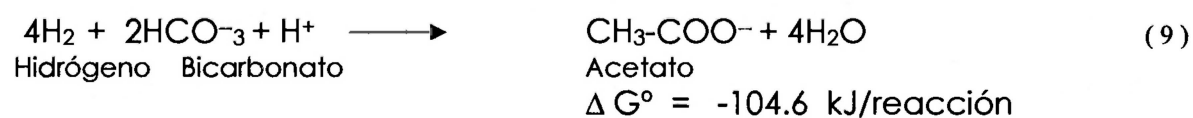
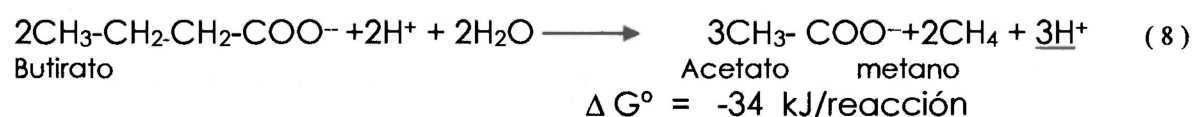
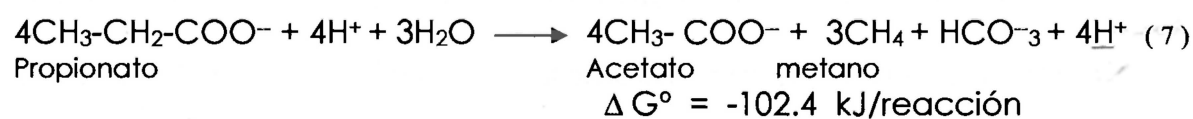
➤ Conversión de H₂ y CO₂ en metano y agua



➤ Conversión de ácido acético en metano y dióxido de carbono:



En la relación sintrófica o sintrópica como la llaman Metcalf y Eddy (1997), los organismos metanogénicos utilizan el hidrógeno producido por los acidogénicos debido a su eficacia en la acidogénesis. Esta relación de sintrofia se conoce como **transferencia interespecie de hidrógeno**, donde las bacterias metanogénicas hidrogenófilas consumen el H_2 producido por las OHPA, lo que mantiene la presión parcial de dicho gas a los niveles necesarios y así propicia las condiciones termodinámicas adecuadas para la transformación de los ácidos grasos en acético e hidrógeno, ver las siguientes reacciones:



Cuando existen concentraciones de H_2 en el biogas de 500-50,000 ppm la degradación del propionato a acetato se detiene (Mosey, 1983), lo que muestra que las bacterias metanogénicas eliminan compuestos

que inhiben el crecimiento de acidogénicos, reflejando un equilibrio dinámico.

2.5 Factores del Medio Ambiente

Los tratamientos biológicos de las aguas residuales contienen una mezcla de microorganismos que son capaces de metabolizar los residuos (Seoanez, 1995).

En la mayoría de los casos los microorganismos involucrados en la digestión anaeróbica son muy sensibles al medio ambiente, por lo que requieren condiciones ambientales específicas para su reproducción y actividad óptima. Lo anterior se verá reflejado en un incremento en la biomasa, así como en altos porcentajes de remoción de materia orgánica (WEF, 1996). Entre los parámetros más importantes, se tienen:

2.5.1. Sustrato. Menéndez y Pérez (1991), lo definen como los compuestos orgánicos a ser estabilizados por las bacterias. En la digestión, el sustrato está constituido generalmente por compuestos orgánicos muy complejos, que como ya fue mencionado, a través de sucesivas etapas son transformados hasta obtener el producto final formado fundamentalmente por CH_4 , CO_2 y otros compuestos estables y de relativo bajo contenido energético.

2.5.2. pH. Durante la etapa de acidificación, el pH baja debido a la producción de ácidos volátiles. En el proceso de digestión anaeróbica, el rango de interés se encuentra entre 6.0 y 8.0, encontrándose el rango óptimo dependiendo de los diferentes grupos involucrados en la digestión. Así por ejemplo según el IMTA (1993), para las bacterias acidogénicas el pH óptimo está entre 5.0 y 6.5 y para las metanógenas debe de estar entre 6.8 y 7.2, donde cambios ligeros afectan su crecimiento. Kroeker (1979), menciona que si el pH baja de 6 los ácidos volátiles no ionizados (en el intervalo de 30-60 mg/l como ácido acético) son tóxicos para las bacterias metanogénicas. Lo mismo sucede si el pH sube de 8 por efecto de la amonía. Estos valores reflejan su ionización (WEF, 1996). La influencia del pH sobre la producción del metano está relacionada principalmente con la concentración de los ácidos grasos volátiles (AGV's) provenientes de la fase acidógeno.

El sistema de pH se define por la relación ácido-base y se controla por la concentración de CO_2 de la fase de gas y la alcalinidad del bicarbonato de la fase líquida (CYDSA-ATLATEC, 1995).

2.5.3. Alcalinidad. En lo referente a alcalinidad, los bicarbonatos de calcio, magnesio y amonio, son ejemplo de sustancias típicas

encontradas en un digestor, producida esta última en el proceso de digestión y las otras, contenidas en el lodo (WEF, 1996). La alcalinidad desempeña un papel importante en los procesos anaeróbicos, como lo consideran Menéndez y Pérez (1991), ya que compensa la producción de CO_2 y ácidos volátiles. También mencionan que en un digestor anaerobio se debe tener una alcalinidad de 2000 a 5000 mg/l cuando el biogas tiene un 30 por ciento de CO_2 (Figura 4); en tanto que los anteriormente mencionados opinan que es de 1,500 mg/l.

Cuando no se tenga la alcalinidad necesaria, ésta debe adicionarse, tomándose la precaución de que la base que se añada no tenga asociado un catión tóxico. Así también el sodio y el amonio pueden inhibir a las bacterias anaeróbicas, por lo que se debe cuidar durante el control del pH para evitar que se alcancen concentraciones tóxicas de estos químicos (Cydsa-Atlatec, 1995).

Las determinaciones de alcalinidad y de ácidos volátiles pueden ser utilizadas, simultáneamente, como indicadores de la condición de la digestión.

2.5.4. Nutrientes. Un tratamiento biológico y específicamente la digestión anaerobia, requiere que las aguas residuales contengan

suficientes cantidades de carbono, nitrógeno, fósforo (macronutrientes) y de elementos minerales para que la síntesis microbiana sea correcta (Seoanez, 1995).

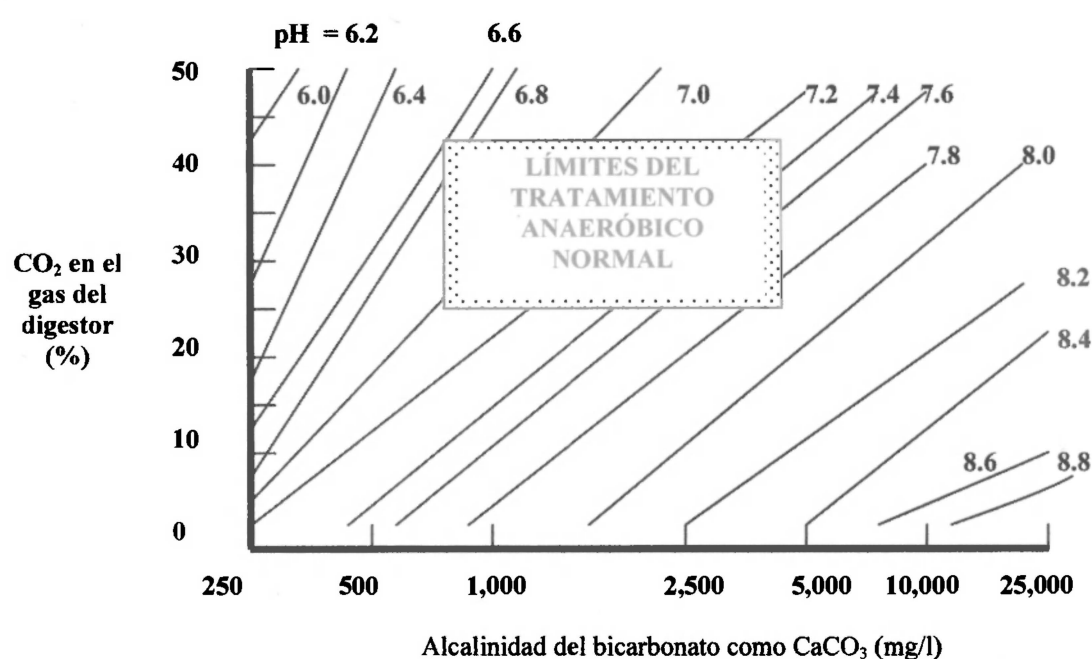


Figura 4. Relación entre el pH y la concentración del bicarbonato a 35°C.

En estudios llevados a cabo por Speece y Mc Carthy (1964) han comprobado que el requerimiento de nitrógeno para el proceso anaeróbico es sólo una pequeña fracción (0.2 a 0.5) de lo requerido en el proceso aerobio, debido a la baja tasa de crecimiento (síntesis celular) de las bacterias anaeróbicas. Las necesidades de este elemento dependen del volumen de la biomasa y de la cantidad de carbono; por ejemplo para obtener 60 m³ de metano se requiere 1 kg de nitrógeno y la relación C:N debe ser de 75:1 si se quiere una buena operación. Así

mismo, el requerimiento de fósforo es aproximadamente el 15 por ciento con respecto al nitrógeno. También la relación DBO/N/P debe estar controlada ya que se asume que el 10 por ciento de DQO biodegradable es convertida a nuevas células.

Si se requiere adicionar nutrientes el IMTA (1993) recomienda para nitrógeno: urea, amonio acuoso y para fósforo: ácido fosfórico o alguna sal fosfatada.

➤ **Elementos Traza:** Además de los macronutrientes, las bacterias metanógenas requieren de pequeñas concentraciones (mg/l) de elementos traza ya que forman parte de su composición (Cuadro 2) o son necesarios para que puedan llevar a cabo sus actividades.

El mismo Autor considera las actividades de los micronutrientes: Hierro (Fe), Cobalto (Co) y Níquel (Ni) son obligatorios requiriéndose en concentraciones de 0.5 a 1.0, 0.1-0.2 y 0.2-0.4 mg/l, respectivamente. El Fe es importante en la conversión de ácido acético a metano; el Co es necesario en la formación de Metilcobalamina (coenzima que activa la producción de metano), mientras que el Níquel es esencial en la constitución del citocromo de la coenzima F₄₃₀ y F₄₂₀. La actividad de

conversión de ácido acético a metano por las bacterias sulfato reductoras está relacionada con la concentración de molibdeno.

Cuadro 2. Composición elemental de las bacterias metanógenas. IMTA (1993)

ELEMENTO	Concentración (mg/kg) Células Secas
N	65,000
P	15,000
S	10,000
Ca	4,000
K	10,000
Mg	3,000
Fe	1,800
Ni	100
Co	75
Mo	60
Zn	60
Mn	20
Cu	10

El azufre (H_2S en solución acuosa) es otro elemento considerado por Speece (1983), doblemente esencial para la actividad de las bacterias metanogénicas, ya que en bajas concentraciones estimula su actividad y a elevadas (100 a 150 mg/l) la inhibe, considerándose como óptimo de 1 a 25 mg/l. Además, los sulfuros pueden causar la precipitación del Fe, Co y Ni. Sus efectos son despreciables en la digestión anaerobia. La adición de Fe puede reducir la inhibición de sulfuros mediante la remoción del azufre (S) como sulfuro ferroso (FeS).

El IMTA (1993) reporta que una concentración de 250 mg de $\text{H}_2\text{S}/\text{l}$ en un rango de pH entre 6.4 y 7.2 inhiben un 50 por ciento la actividad metanógena del lodo granular, reflejándose en una disminución de gas.

Para la digestión anaerobia se han reportado como concentraciones límites de sulfuro disuelto en el influente 200 a 300 mg $\text{H}_2\text{S}/\text{l}$, mientras que la concentración en el biogas de salida no debe sobrepasar el 6 por ciento.

El Tungsteno y el selenio también se reportan como elementos traza requeridos, pero no son estrictamente indispensables (Speece, 1983), formando parte del metabolismo de las bacterias acetogénicas y metanogénicas.

Sin embargo, en un estudio realizado por Fang y Hui (1994) se encontró que los metales y el orden en que se inhibió la actividad metanogénica, fueron: Zn, Ni, Co, Cr y Cd.

Los efectos variables de los metales pesados y de sus sales en la operación de los digestores anaeróbicos no son claros según el IMTA (1993), ya que la concentración de los agentes precipitantes como sulfuros y carbonatos varía de un sistema a otro, lo cual altera la cantidad de los metales.

2.5.5. Toxicidad. La mayoría de toxinas en los digestores están formadas por compuestos orgánicos, metales pesados, amoníaco, sulfuros, oxígeno y sal (WEF, 1996).

Cydsa-Atlatec (1995), consideran que mucha de la información publicada acerca de la toxicidad en los sistemas de digestión anaerobia es equivocada y engañosa debido a técnicas de experimentación inadecuadas y a una falta general de comprensión del término toxicidad. Así pues se deben de considerar los siguientes fundamentos:

- La mayoría de las toxinas afectan a los microorganismos siempre y cuando estén en solución, ya que de lo contrario no penetrarán la pared celular y no podrán inhibir el desarrollo de dichos microorganismos. Concepto que es compartido por WEF (1996).

- La toxicidad es un término relativo. Existen compuestos orgánicos e inorgánicos que una vez solubilizados pueden ser estimulantes o tóxicos. Un buen ejemplo es el mostrado en los cuadros 3 y 4 del nitrógeno amoniacal, sobre la digestión anaeróbica, además de los fundamentos anteriores IMTA (1993) considera en el aspecto de toxicidad:

- Compuestos con una toxicidad inmediata y/o irreversible como la provocada por el tetracloruro de carbono (CCl_4), cloruro de etileno (CH_2Cl_2) y cloruro de metilo (CH_3Cl) en cuyo caso se menciona un efecto bactericida.

Cuadro 3. Efecto del nitrógeno amoniacal en la digestión anaeróbica (IMTA, 1993).

Concentración de Amonia como N ^a (mg/L)	Efecto
50-200	Benéfico
200-1,000	Sin efectos adversos
1,500-3,000	Inhibitorio en pH de 7.4 a 7.6
> 3,000	Tóxico

^a Nitrógeno

Cuadro 4. Concentraciones estimulantes e inhibitorias de cationes metálicos ligeros (IMTA, 1993).

Cation	Concentración (mg/l)		
	Estimulante	Moderadamente Inhibidor	Fuertemente Inhibidor
Calcio	100-200	2,500-4,500	8,000
Magnesio	75-150	1,000-1,500	3,000
Potasio	200-400	2,500-4,500	12,000
Sodio	100-200	3,500-5,500	8,000

➤ Compuestos cuya toxicidad está relacionada con el pH, por ejemplo los AGV's, amoníaco y sulfuro de hidrógeno. Los lodos son muy benéficos, sin embargo los metales y compuestos orgánicos, así como los microorganismos patógenos, son un problema (US EPA, 1983; Environmental Canada, 1984 y Nicholson, 1991).

➤ **Aclimatación.** Los microorganismos pueden aclimatarse y mostrar tolerancia a niveles altos de tóxicos siempre que estos materiales se incrementen lentamente dentro del medio. Bajo condiciones de cargas choque o pico, no existe tiempo suficiente para que este arreglo se lleve a cabo y el proceso de digestión fracasa (WEF, 1996).

➤ **Antagonismo y Sinergia.** El antagonismo lo define Cydsa-Atlatec (1995), como la reducción del efecto tóxico de una sustancia por la presencia de otra. Estas son relaciones muy importantes en toxicidades catiónicas. Asimismo mencionan como materiales tóxicos potenciales a los siguientes:

➤ **Ácidos volátiles.** Hasta los años sesenta se consideraban tóxicos para la digestión anaeróbica si excedían de 2,000 mg/l. Además del límite máximo permisible, CIDSA-ATLATEC (1995) reporta la existencia de una controversia muy considerable acerca de si se debía o no agregar sustancias alcalinas para mantener la capacidad amortiguadora adecuada.

Mc Carty (1964), publicó resultados de estudios cuidadosamente controlados en los que demostró:

"Que los ácidos volátiles en concentraciones superiores de 6,000-8,000 mg/l no eran tóxicos para las bacterias metanogénicas siempre y cuando el pH permanezca en el sistema dentro del rango de 6.6-7.4" y "que el control del pH se pueda mantener por medio de adición de materiales alcalinos, mientras que el catión asociado no cause toxicidad". Se encontró que el sodio, el potasio o compuestos de amoníaco eran dañinos, no así el magnesio o calcio.

➤ **Metales pesados.** Se ha mencionado a la toxicidad de los metales pesados como causa de fallas en la digestión anaeróbica, aunque en concentraciones pequeñas la mayoría de ellos son necesarios para el desarrollo biológico. La concentración de metales en los lodos del agua residual cruda puede ser problemática, aunado a que en el influente de la misma no pueden ser detectados sino que se concentran en el lodo debido a que tienden a adherirse a las partículas de lodo.

Estos metales pueden eliminarse mediante un tratamiento secundario estándar a la adición de alumbre (Al_2O_3). En sistemas de tratamiento que se agregan coagulantes para la eliminación del fosfato, también lo hará una gran cantidad de metales pesados influentes. También el carbonato y el sulfuro participan en esta acción a través de la precipitación y el secuestro. Por lo tanto, no es posible definir concentraciones tóxicas totales precisas para cualquier metal pesado. Sin embargo, en el Cuadro 5 se pueden observar concentraciones totales individuales de metales que han causado inhibiciones muy severas, para lo cual la condición es que se encuentren solubles. La inhibición de la digestión anaeróbica ocurre a concentraciones solubles de aproximadamente 3 mg/l para Cr; 2 mg/l para Ni; 1 mg/l para Zn y 0.5 mg/l para Cu. Con excepción del Cr, la toxicidad por metales

pesados en digestores anaeróbicos puede prevenirse o eliminarse mediante la precipitación con sulfuros. El Cr hexavalente por lo general se reduce a trivalente, el cual bajo condiciones de pH normales en el digestor, es relativamente insoluble y poco tóxico (Cydsa-Atlatec, 1995).

Cuadro 5. Concentraciones totales de metales individuales requeridas para inhibir seriamente la digestión anaeróbica (Cydsa-Atlatec, 1995).

Concentración en el contenido del digestor			
Metal	Metal como porcentaje de sólidos secos	Mmol. del metal por kg de sólidos secos	Metal Soluble Mg/l
Cobre	0.93	150	0.5
Cadmio	1.08	100	--
Zinc	0.97	150	1.0
Fierro	9.56	1710	--
Cromo			
+6	2.20	420	3.0
+3	2.60	500	--
Níquel	--	--	2.0

➤ **Cationes metálicos ligeros.** Las aguas residuales domésticas tienen bajas concentraciones de sodio, magnesio, potasio y calcio. Sin embargo, algunas contribuciones significativas son producto de operaciones industriales y por la adición de materiales alcalinos para el control del pH. Cada uno de estos cationes puede ser estimulante o tóxico, dependiendo de la concentración (Cuadro 6) pero algunas combinaciones de ellos formarán ya sea una relación antagónica o de sinergia (WEF, 1996).

Cuadro 6. Combinaciones antagónicas y sinérgicas de cationes. (WEF, 1996)

Cationes Tóxicos	Cationes Sinérgicos	Cationes Antagónicos
Amoníaco	Calcio, magnesio, potasio	Sodio
Calcio	Amoníaco, magnesio	Potasio, sodio
Magnesio	Amoníaco, calcio	Potasio, sodio
Potasio	-----	Amoníaco, calcio, magnesio, sodio
Sodio	Amoníaco, calcio, magnesio	Potasio

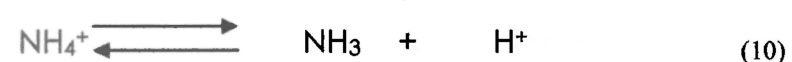
➤ **Oxígeno.** Muchos ingenieros han expresado interés sobre la posibilidad de la toxicidad causada por oxígeno debido al uso de espesadores flotantes por aire disuelto. Cydsa-Atlatec (1995) reportan trabajos en los que la producción de gas disminuyó cuando se inyectó oxígeno por un tiempo determinado y cesó cuando el tiempo se incrementó.

➤ **Sulfuros.** Concentraciones de sulfuro mayores de 200 mg/l son tóxicos para los sistemas de digestión anaeróbicos. La concentración de sulfuro soluble dentro del digestor está en función de la fuente entrante de azufre, el pH, el rango de la producción de gas y la cantidad de metales pesados disponibles para combinarse con él y precipitarse (Cydsa-Atlatec, 1995).

➤ **Amoniaco.** Es producto de la degradación aeróbica de las proteínas y la urea puede alcanzar niveles tóxicos en los lodos altamente

concentrados. Se han encontrado dos formas de amoniaco (Cydsa-Atlatec, 1995) en este tipo de digestión: el ion amonio (NH_4) y el amoniaco disuelto (NH_3); este último es el más tóxico que el ion amonio a concentraciones más bajos.

Las dos formas se encuentran en equilibrio y la concentración relativa de cada uno depende del pH, como lo indica la ecuación No. 10.



A pH bajo, el equilibrio cambia hacia la izquierda y la toxicidad del ion amonio se transforma en un problema. A pH más alto, el equilibrio cambia hacia la derecha y la inhibición se relaciona con la concentración del amoniaco. La toxicidad del amoniaco se evalúa analizando las concentraciones de N-amoniaco, si éste es mayor de 1500-3000 mg/l el pH se encuentra arriba de 7.4 a 7.6. Por lo que para evitar este efecto tóxico se recomienda bajar el pH a 7.0-7.2 con la adición de HCl. Si el N-amoniaco sobrepasa los 3000 mg/l entonces el ion NH_4^+ será tóxico sin importar el valor del pH y la única solución es el lodo residual entrante.

2.5.6. Temperatura. La reducción de los sólidos, específicamente la porción volátil, es uno de los objetivos principales de la digestión

anaeróbica. No sólo hace al lodo menos putrescible, sino que también reduce la cantidad de sólidos para la disposición final. Por lo tanto, el desempeño del digestor se basa en parte, en la reducción de sólidos volátiles que generalmente se encuentran dentro de un rango de 35 y 60 por ciento. Esta biodegradación depende en gran parte de la temperatura de la digestión, como lo muestra la Figura 5, reportada por Cydsa-Atlatec (1995). El rango de crecimiento de los microorganismos se incrementa con la temperatura, el control de este factor es principalmente en invierno, ya que la ayuda a mantener el balance microbiano y mejora el proceso de digestión.

Así como el rango de crecimiento de los microorganismos se incrementa con la temperatura, lo hace también la producción de metano y la reducción de sólidos volátiles (SV), lo que significa que la estabilización de la M.O. decrece a bajas temperaturas, debiéndose poner atención especial en el periodo de invierno (WEF, 1997).

En el Cuadro 7 de IMTA (1993), se resumen algunas características del proceso en función de cada intervalo de temperatura.

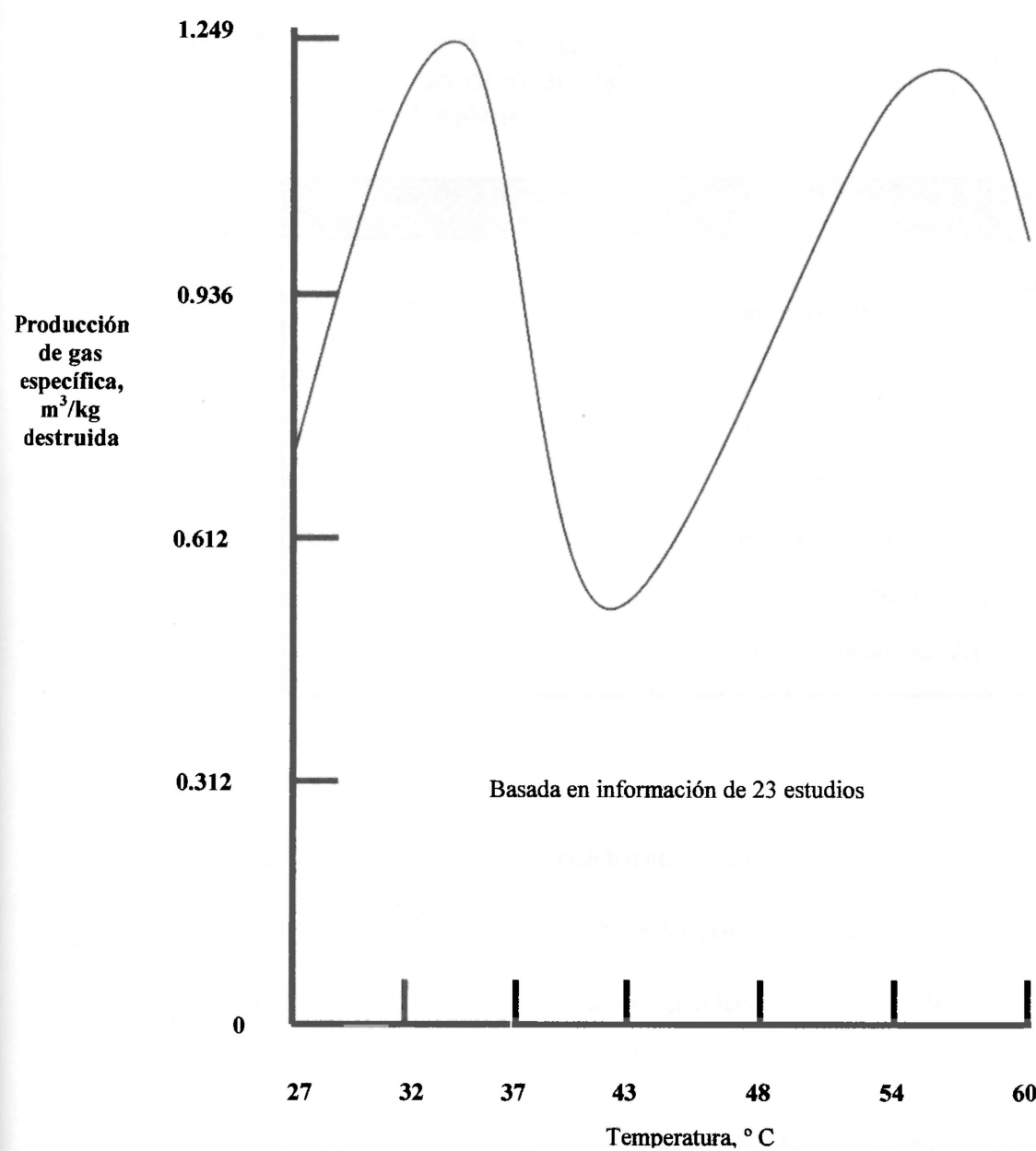


Figura 5. Efecto de la Temperatura sobre la producción de gas (WEF, 1997)

Las bacterias metanógenas pueden aparecer activas a temperaturas de 8 a 10 $^{\circ}\text{C}$, pero la actividad de la biomasa y la eficiencia del tratamiento anaerobio disminuyen entre 10 y 20 por ciento de los valores obtenidos a 35 $^{\circ}\text{C}$ (Stronach *et al.*, 1986).

Cuadro 7. Características del proceso de digestión anaerobia, de acuerdo al intervalo de temperatura en que se efectúa la Metanogénesis (IMTA, 1993).

MESÓFILA (20 a 40°C) (Optima 37°)	TERMOFILA (45 A 65°C) (Optima 55°)
Menos vapor de agua en el gas	Mayor actividad y capacidad del procesamiento del lodo
Mayor población metanógena	Menor TRH
Menos CO ₂ en el gas	Menor formación de lodo
Balance energético más favorable	Destrucción de microorganismos patógenos
Mayor experiencia en su aplicación	Equilibrio microbiano frágil
	Mayor actividad metanógena de la biomasa
	Mejora el desaguado del lodo

En el caso de aguas residuales con temperaturas elevadas, la operación termófila a 50 y 60°C puede ser adecuada, debido a que en este intervalo se alcanzan altas velocidades de reacción.

Sin embargo, es poco común por lo difícil que es mantener estas temperaturas y por la fragilidad de la población anaerobia, ya que en el caso de la metanogénesis termófila, la respuesta a cambios de temperaturas súbitos, cesa temporalmente la actividad. Por lo anterior, se recomienda que el cambio de temperatura sea gradual y así evitar que la actividad no se detenga totalmente. Esto trae como consecuencia una disminución de la estabilidad ecológica en un

proceso termófilo y lo hace inadecuado como tratamiento en aquellos casos en donde existen cambios continuos de temperatura (IMTA, 1993).

En 1990, en Canadá, transformaron los digestores mesófilos en termófilos, para eliminar coliformes y *Salmonella* (WEF, 1997). En el mismo año, la Universidad de Iowa hizo investigaciones sometiendo el lodo a una base termófila y a otra Mesófila para reducir los sólidos volátiles e incrementar la producción de gas metano. Sin embargo, los mismos autores invirtieron el orden de las tases de temperaturas y encontraron disminución de coliformes fecales y *Salmonella* y no detectaron enterovirus ni huevos de helmintos. Plachy *et al.* (1997) estudiaron el efecto de la digestión Mesófila (36°C) y termófila (54°C) en los huevecillos de *Ascaris suum*, resultando sólo una disminución en el primer sistema, mientras que en el segundo, fueron eliminados totalmente.

La factibilidad de estabilizar el lodo con tratamiento termófilo aeróbico fue estudiada por Mason *et al.* (1992), lo cual no se logró, pero menciona que podría darse con un pretratamiento mesófilo anaeróbico.

2.5.7. Mezclado. Uno de los aspectos más importantes para lograr optimizar el rendimiento del proceso lo es el mezclado adecuado (Metcalf y Eddy, 1997), ya que los agitadores

aumentan la velocidad de digestión, aceleran la generación y producción del biogas, promueven el intercambio de calor y ayudan a mantener un mejor control del pH. Además, logra rápidamente el contacto entre el lodo crudo y los microorganismos y distribuye uniformemente los productos metabólicos de deshecho y sustancias tóxicas (Cydsa-Atlatec, 1995).

Hacen también referencia que antes de establecer cualquier programa se debe determinar la cantidad y calidad del biogas. Así por ejemplo, en un proceso de digestión saludable el resultado es un biogas con la composición siguiente:

- Metano 65-75 %
- CO₂ 30-35 %
- N₂, H₂, H₂S niveles bajos
- vapor de agua y otros gases

Se ha encontrado que la concentración de CO₂ se incrementa con el rango de carga y que el aumento de H₂S en el biogas se debe al decremento de la temperatura y el contenido de éste se afecta por la composición química del lodo. El azufre en los residuos industriales y en la infiltración del agua salada tiende a incrementar los niveles de H₂S en el biogas, lo cual se debe al decremento de la temperatura y el

contenido de éste se afecta por la composición química del lodo, siendo uno de los principales responsables del olor del mismo, pudiendo ser también corrosivo en presencia de humedad al formar ácido sulfúrico (Cydsa-Atlatec, 1995).

2.6. Microbiología de la Digestión Anaeróbica

2.6.1. Aspectos Generales

Los sistemas de tratamiento biológico del agua residual se basan en la capacidad que tienen los virus, hongos, algas, protozoarios, rotíferos, nemátodos y bacterias para degradar la M.O., de la que obtienen estas últimas la energía necesaria para realizar sus funciones vitales y la síntesis celular.

Las reacciones bioquímicas que tienen lugar en forma natural en los cuerpos de agua o bajo condiciones controladas en las plantas de tratamiento, se clasifican según el IMTA (1993), en base al metabolismo de los microorganismos que la realizan, en tres grandes grupos:

- **Aerobios.** Estas reacciones se producen en presencia de oxígeno.
- **Anaerobios.** Se llevan a cabo en ausencia del mismo.

- **Facultativos.** Actúan en uno u otro de los mecanismos anteriores de acuerdo con las condiciones del medio.

2.6.2. Bacterias formadoras de ácidos. Entre las bacterias no metanogénicas que se han podido aislar se encuentran las facultativas y anaeróbicas estrictas de crecimiento rápido (tiempo mínimo de duplicación: 30 minutos):

- *Clostridium spp.*
- *Peptococcus anaerobus*
- *Bifidobacterium spp.*
- *Disulphovibrio spp.*
- *Corynebacterium spp.*
- *Lactobacillus*
- *Actinomyces*
- *Staphilococcus*
- *Escherichia coli*
- *Acetobacterium*

Higgins y Burns (1975) incluyen otros grupos fisiológicos que producen enzimas proteolíticas, lipolíticas, y ureolíticas o celulíticas:

2.6.3. Bacterias Acetógenas Productoras Obligadas de Hidrógeno (OPHA). Su existencia fue deducida, según el IMTA (1993), a partir de las limitaciones metabólicas conocidas de otro grupo de bacterias. El hidrógeno que producen inhibe su desarrollo por lo que viven en una

relación sintrófica con las bacterias metanógenas hidrogenófilas (MH) que son las que se encargan de consumir el H_2 producido.

2.6.4. Bacterias Acetógenas. Este grupo es capaz de transformar una mezcla de hidrógeno, dióxido de carbono y algunos sacáridos como la glucosa y fructosa en acetato. (Ver reacción N° 9).

Entre las especies acetógenas mesófilas más estudiadas se encuentran :

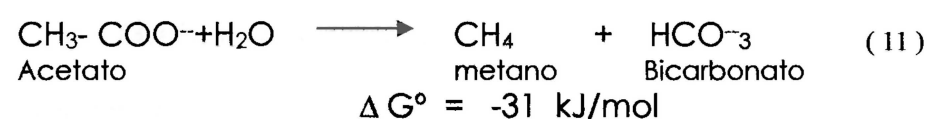
- *Clostridium formicoaceticum*
- *Acetobacterium wodii*
- *Acetobacterium wieringae*
- *Clostridium aceticum*

En esta etapa ácida las bacterias crecen en un medio caracterizado como sigue según (WWTD, 2000):

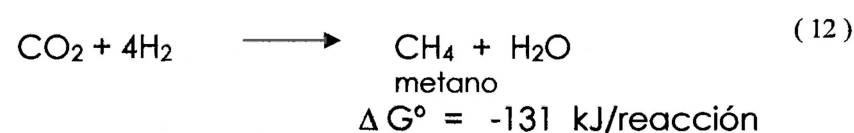
- pH varía de 5.0 a 7.0
- Se producen sulfuro de hidrógeno y bióxido de carbono
- Ocurre muy poca estabilización
- Contenido de nitrógeno entre 1 a 5 por ciento

2.6.5. Bacterias Metanógenas. Son esenciales para la digestión anaerobia debido a que son las únicas que pueden transformar el acetato e hidrógeno en metano y dióxido de carbono, que son productos finales de la fermentación. Los metanógenos son capaces de utilizar el H_2 producido por los acidogénicos y otras bacterias anaerobias debido a su eficiencia en la hidrogenesis, así como eliminar compuestos

que pueden inhibir el desarrollo de los microorganismos acidogénicos (Metcalf y Eddy, 1997). Estas reacciones se llevan a cabo en ausencia de energía luminosa (Reacción N° 11) o aceptores de electrones exógenos como oxígeno (O₂), nitritos (NO₂), nitratos (NO₃) y sulfatos (SO₄) de acuerdo a los reportes del IMTA (1993).



A las bacterias que transforman el acetato a metano, se llaman metanógenas acetoclásticas: *Methanosarcina thermotilia* y *Methanotherix soehngenii*. Esta reacción es de suma importancia por la digestión anaerobia, debido a que produce el 73 por ciento del metano. Las metanógenas hidrogenófilas son las que utilizan el hidrógeno proveniente de la fermentación para formar metano según la reacción siguiente:



El mismo Instituto menciona que esta reacción tiene una doble función en el proceso de digestión anaerobia, ya que por un lado se produce metano y por el otro elimina el H₂ gaseoso por lo que permite a las bacterias acetógenas continuar con la síntesis del ácido acético. El H₂ también controla las velocidades a las que el ácido propiónico y butírico son convertidos en ácido acético de acuerdo con la relación

sintrófica. Por lo tanto, se puede considerar que las metanobacterias que utilizan el H_2 regulan la digestión anaeróbica. Los géneros más representativos son:

- *Methanobacterium arboriphilicus*
- *Methanospirillum hungate*
- *Methanobacterium formicicum*

Según Prescott *et al.* (2000), las bacterias metanógenas son de gran importancia práctica, ya que el metano es un combustible de quemado limpio y una fuente de energía excelente como ha sucedido durante muchos años en las plantas de tratamiento de aguas residuales para producir electricidad y calor.

Recientemente se ha descubierto que los metanógenos pueden oxidar el hierro elemental (Fe^0) y utilizarlo para producir metano y energía. Esto significa que los metanógenos que crecen en torno a las tuberías y otros objetos de hierro enterrados o sumergidos pueden contribuir de forma importante a la corrosión del hierro.

Los mismos autores consideran la metanogénesis como un problema ecológico, ya que los niveles atmosféricos del metano se han incrementado en los últimos 300 años aproximadamente un uno por ciento anual (desde 0.7 a 1.7 ppm en volumen), procediendo de las diferentes fuentes como lo muestra la Figura 6, además del producido por los arrozales, de los rumiantes, minas de carbón, instalaciones de

tratamiento de aguas residuales, los vertederos, pantanos e intestino de las termitas.

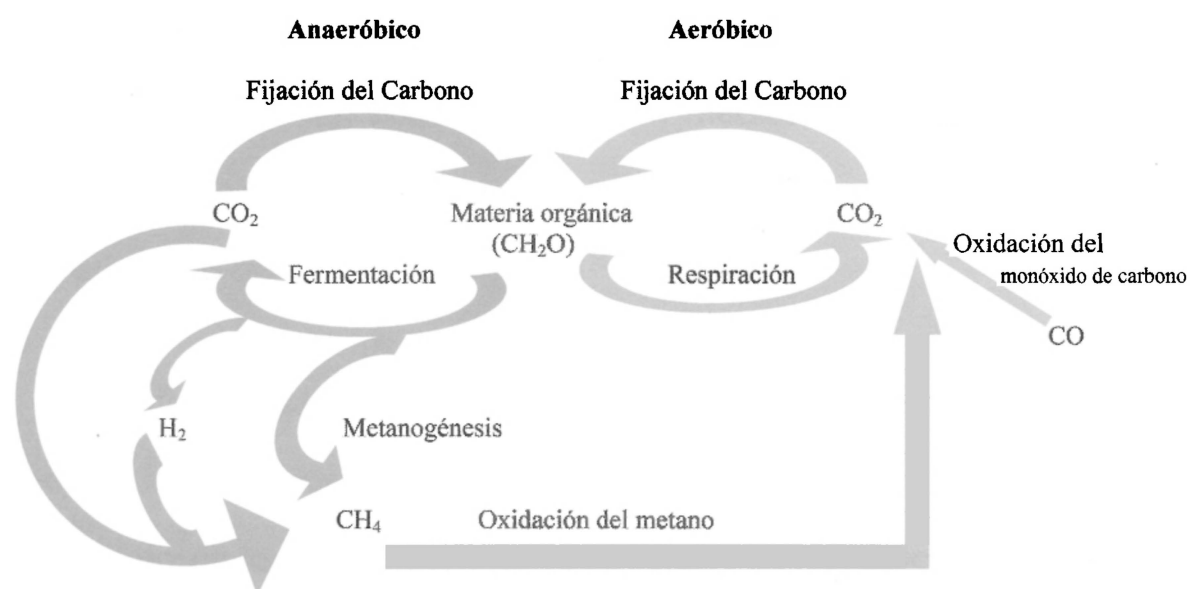


Figura 6. Ciclo básico del carbono en el ambiente (Prescott *et al.*, 2000).

2.7. Taxonomía de Archaeo

De acuerdo con Prescott *et al.* (2000), no hay una clasificación de bacterias universalmente aceptada, pero el sistema adaptado por muchos bacteriólogos es el conocido como Manual de Bacteriología Determinativa de Bergey.

El dominio Archaea o las arqueobacterias (del griego *archaios*, antiguo y *bakterion*, bastoncillo) es bastante variado, tanto en su morfología como en su fisiología. Pueden ser grampositivas o gramnegativas y tener forma esférica, bacilar, espiral, laminada,

irregular, etc. Algunas son células únicas, mientras que otras forman agregados o filamentos. Pueden ser aerobias, anaerobias facultativas o estrictas; algunas son mesófilas y otras hipertermófilas (temperaturas mayores de 100° C). Pueden crecer en medios acuáticos y terrestres extremos. Con frecuencia están presentes en medios anaerobios, hipersalinos o de altas temperaturas.

Recientemente se han descubierto arqueobacterias también en medios fríos. Parece que componen el 34 por ciento de la biomasa procariota en las aguas costeras superficiales del Antártico; algunas son simbioses en los sistemas digestivos animales.

El manual Bergey actualmente divide a las arqueobacterias en cinco grupos principales:

Arqueobacterias metanogénicas, reductoras de sulfatos, halófilas extremas, sin pared celular y termófilas extremas metabolizadoras del S°.

Este dominio las divide en dos reinos:

Euryarchaeota: Del griego **eurus**= amplio; **archaios**=antiguo.

Crenarchaeota: Del griego **crene**=fuente o manantial; **archaios**.

Los euriarqueotas reciben este nombre por el amplio número de nichos ecológicos que ocupan y presentan diversos patrones metabólicos. A este reino pertenecen los metanógenos, halógenos

extremos, utilizadores de sulfatos y las termófilas extremas con metabolismo dependiente del azufre.

El reino se divide en cuatro secciones como lo muestra la Figura 7 donde se observan los organismos representativos de cada una de ellas.

En base a estudios genéricos y bioquímicos el grupo de las bacterias metanógenos pertenecen al reino Euryarckeota donde son el grupo dominante, distinguiéndose al menos 3 órdenes y 25 géneros que se diferencian de forma substancial en su forma, secuencia de rRNA 16S, la composición química y la estructura de la pared celular, los lípidos de membrana y otras características (Prescott *et al.*, 2000).

Los mismos autores mencionan que el metabolismo de los metanógenos es poco frecuente y su capacidad de producir metano anaeróbicamente se debe a la presencia de diversos cofactores únicos como la coenzima M(CoM) y la coenzima F₄₂₀, que transporta los electrones e hidrógenos y la F₄₃₀ actúa de cofactor para la enzima metil-CoM metilreductasa. Esta última toma parte en la síntesis de metano como portadora de grupos metilo, a través de un metil CoM intermedia, por lo que puede inferirse su capacidad para producir metano anaeróbicamente, su metabolismo es poco frecuente.

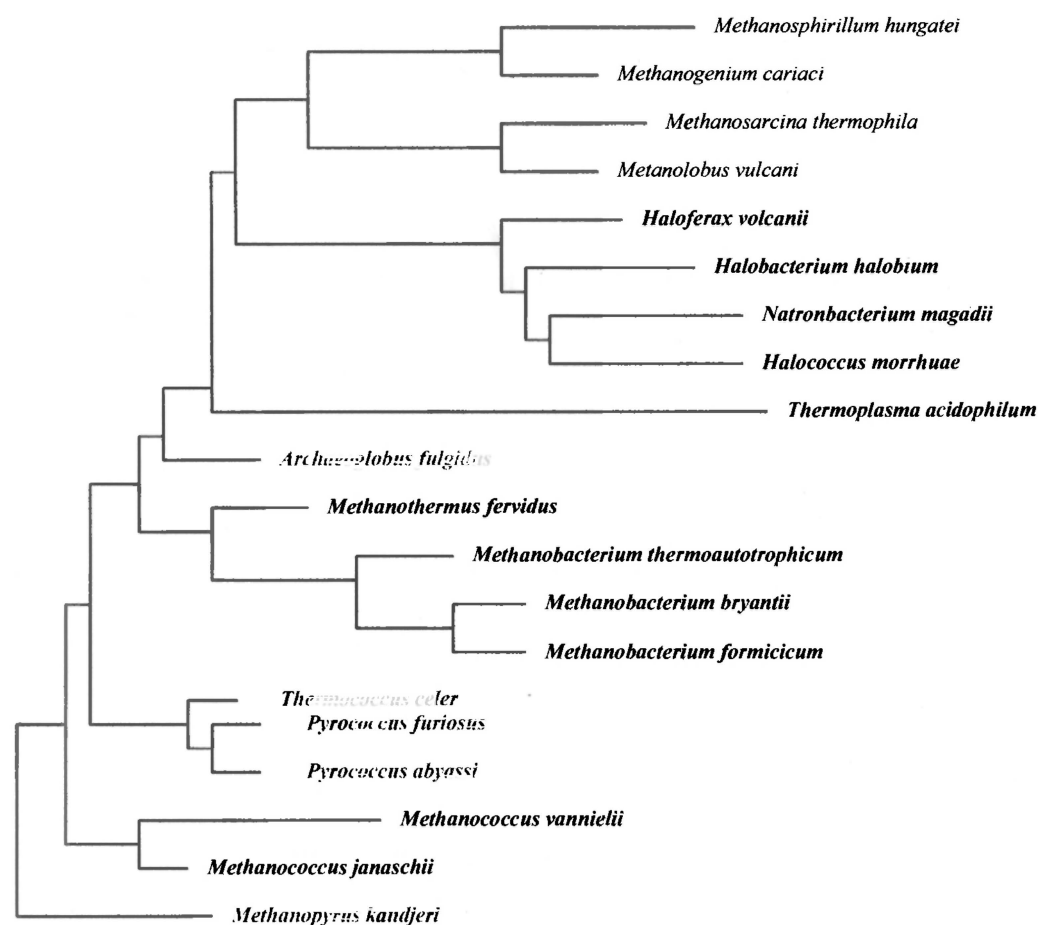


Figura 7. El Reino Euryarchaeota. El dendrograma muestra organismos representativos de los cuatro grupos principales: metanógenos (verde), halobacterias (púrpura), thermoplasmas (naranja) y termococos (rosa). Prescott et al. (2000).

La composición inorgánica de las bacterias metanógenas, muestra que contiene los nutrientes esenciales: nitrógeno (N), fósforo (P), azufre (S), en concentraciones normales, mientras que algunos micronutrientes como níquel (Ni), hierro (Fe) y cobalto (Co), están presentes en concentraciones más altas a diferencia de otros microorganismos, lo que implica un requerimiento particular de estos elementos en dichas bacterias (IMTA, 1993).

Uno de los géneros más representativos de los metanógenos, de acuerdo con Prescott *et al.* (2000) es *Methanobacteriales* al que pertenece *Methanobacterium* que pueden ser bacilos largos o filamentosos; reacción Gram+ a variable y utilizan H_2 y CO_2 .

Los metanógenos crecen muy bien en medios anaerobios ricos en materia orgánica: el rumen y el sistema intestinal de los animales, los sedimentos marinos y de agua dulce, los pantanos y ciénegas, las fuentes termales, los digestores anaeróbicos del lodo e incluso en el interior de protozoos anaerobios.

Estos organismos tienen importancia desde el punto de vista ecológico. La producción de metano puede ser tan elevada, que en ocasiones pueden subir a la superficie burbujas de metano en los lagos o estanques. Los metanógenos del rumen son tan activas que una vaca puede expulsar, mediante el eructo, entre 200 y 400 l de metano al día.

2.8 La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

Desde la antigüedad ya existían técnicas de diagnóstico de enfermedades virales en plantas, técnicas que con el tiempo han ido evolucionando y mejorando su precisión, sensibilidad, tiempo de respuesta, así como su aplicabilidad a mayor número de

microorganismos como hongos, rickettsias, virus viroides, fitoplasmas y bacterias entre otros. No sólo se ha logrado la detección de éstos, sino también su caracterización molecular mediante la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y secuenciación del ADN.

La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) es un método enzimático *in vitro* de amplificación termocíclica de secuencias específicas de ADN inventado por Kary Mullis en 1985. La polimerasa es la enzima responsable de la reacción donde el producto de la polimerización del primer ciclo sirve de molde para el siguiente, logrando así que el número de copias del ADN blanco se duplique exponencialmente en cada ciclo lo que permite que en el nuevo producto sintetizado se pueda visualizar el segmento amplificado en un gel de agarosa o poliacrilamida. Mediante el uso de esta técnica se ha logrado la detección y caracterización molecular de diversos patógenos como son: hongos, rickettsias, virus viroides, fitoplasmas, bacterias (Silva *et al.*, 1999).

Henson y French (1993) consideran que esta técnica ofrece varias ventajas con respecto a los métodos tradicionales de diagnóstico debido a su rapidez y precisión, además los organismos no requieren ser previamente cultivados en medios especiales para su diagnóstico. La técnica también posee una amplia sensibilidad y potencial para

detectar secuencias de algún organismo de interés donde existe una mezcla de material genético y de otros organismos.

2.8.1. Etapas de la PCR.

La PCR se lleva a cabo en ciclos térmicos y en cada uno de ellos se realizan tres pasos fundamentales con temperatura y duración específicos como lo describen Silva *et al.* (1999):

- **Desnaturalización.** Consiste en la separación de las dos cadenas de ADN en hebras sencillas, lo que se logra aplicando una temperatura de 94°C. El calor destruye los puentes de hidrógeno que unen las dos cadenas de la molécula de ADN duplex.
- **Apareamiento.** La ADN polimerasa requiere de una cadena pre-existente de ADN molde y de un pequeño segmento sintético complementario a ella para la síntesis. Este pequeño segmento se le conoce como iniciador o "primer" (oligonucleótido de 15 a 30 bases nucleotídicas) y es usado para alargar o extender la cadena. Para aparear o hibridizar este oligonucleótido a la molécula molde se requiere una temperatura que varía de 45 a 65 ° C. La temperatura seleccionada dependerá de la homología que el iniciador tenga con el ADN molde. Así por ejemplo temperaturas más altas se recomiendan con mayor homología y a la menor, se tiene mayor eficiencia pero menor especificidad en la amplificación.

- **Extensión.** Consiste en la extensión del iniciador, en dirección 5' a 3' por medio de una ADN polimerasa y desoxirribonucleótidos trifosfatados (dNTP's). Esta extensión de los iniciadores formará una cadena complementaria del ADN (ADNc). La temperatura óptima para el funcionamiento de la ADN sucesivamente es de 72°C.

Los tres pasos anteriormente descritos constituyen un ciclo del cual se logra que la molécula del ADN de doble cadena sea copiada para producir dos cadenas de ADN "hijas". En el segundo ciclo las dos cadenas hijas se convierten en 4 y así sucesivamente, por lo que unos cuantos nanogramos de ADN pueden ser amplificados millones de veces en 2-3 horas (Martínez , 2000).

2.8.2. Componentes requeridos

Los componentes típicos de una reacción son: el ADN blanco también se le conoce como molde, plantilla o templado. Este último por su derivación del inglés "template"; iniciadores específicos para aparear al gen o segmento que se pretende amplificar; una enzima ADN-polimerasa termoestable conocida como *Taq* ADN polimerasa; una mezcla de desoxirribonucleótidos (dNTP's): dATP, dTTP, dGTP y dCTP y iones de magnesio (Silva *et al.*, 1999).

➤ **Molde o Blanco.** Para iniciar la prueba de PCR se debe contar de antemano, con el ADN blanco o molde. En la actualidad existen protocolos muy rápidos en donde no es necesario aislar el ADN antes de hacer PCR, sino que se puede trabajar con extractos casi crudos. El método de extracción depende del material a utilizar.

➤ **iniciadores o "primers".** Son fragmentos de ADN sintéticos (oligonucleótidos) homólogos y complementarios a una región de ADN molde que sirve como punto de partida para la polimerización (Almeyda, 1996). La concentración óptima de los iniciadores varía del 0.1 a 0.5 μM (o de 10 a 75 pmoles) por reacción, ya que concentraciones mayores pueden obstaculizar su especificidad y menores, ineficiencia.

➤ **Enzimas Polimerasas Termoestables.** Existen varios tipos siendo más comunes las nativas purificadas a partir de *Thermus aquaticus* (Taq) y *T. thermophilus* (Tth) y sus formas recombinantes en *E. coli*. Todas llevan a cabo reacciones de polimerización del ADN en dirección 5' – 3', copiando el molde de ADN. Para Taq ADN polimerasa se recomienda una concentración de 1 a 2.5 U por reacción de 25 μl para catalizar una PCR típica, ya que si la concentración está en exceso puede amplificar secuencias no específicas.

➤ **Desoxirribonucleótidos trifosfatados (dNTP's).** La mezcla está formada por dATP, dGTP, dTTP y dCTP. Las soluciones de dNTP's se

neutralizan a un pH de 7. Se recomienda tener una alícuota de cada dNTP's a una concentración de 20 a 200 μM (Innis *et al.*, 1990) o de 100 a 200 μM de cada uno (Silva *et al.*, 1999).

➤ **Iones de Magnesio (MgCl_2)** . Actúa como cotactor necesario para que la *Taq* ADN Polimerasa funcione en condiciones óptimas (amplifique) siempre y cuando la concentración varíe de 1 a 1.5 mM. La concentración de los iones de Mg puede afectar además el anillamiento de los primers, las temperaturas de disociación de las cadenas del ADN molde y de los productos de la PCR, así como su especificidad (Innis *et al.*, 1990).

2.8.3. Aplicaciones de la PCR

El surgimiento de técnicas moleculares ha facilitado la detección y diagnóstico de enfermedades causadas por microorganismos ya que hasta el momento éstos no han podido ser cultivados, dificultando su detección por técnicas convencionales. Caso contrario la PCR presenta ventaja sobre éstos debido a que utiliza microorganismos sin necesidad de ser cultivados previamente a su detección, además la técnica es muy sensible, rápida y versátil. Esto permite la diversificación y aplicación en varias áreas de conocimiento lo que generalizará su uso en la detección y caracterización de microorganismos y en el caso de

bacterias metanógenas los métodos fisiológicos tradicionales no son lo suficientemente discriminativos para un número limitado de sustratos.

Daffonchio *et al.* (1998) incluyen la secuenciación del ARNr 16S como un método estándar mínimo para identificar metanógenos. Así mismo llevaron a cabo análisis para caracterizar un fragmento de 300 pb incluyendo las regiones V1 y V2 de ADNr 16S de 30 especies de metanógenos mesofílicos y termofílicos para evaluar polimorfismos de ADNr 16S mediante la longitud de fragmentos polimórficos con el uso de primers específicos; logrando su identificación en miembros del género *Methanobacterium* y de la familia Methanobacteriaceae. Los mismos autores reportan también que existe diversidad molecular entre cepas metanogénicas de las mismas especies que no han sido reconocidas ampliamente. Por otra parte Nöling *et al.* (1993) encontraron diferencias de secuencia en el gen 16S ADNr entre cepas de *Methanobacterium thermoautotrophicum* e identificaron 3 grupos de cepas mediante hibridación de ácidos nucleicos.

Hales *et al.* (1996) utilizaron los primers ME1 y ME2 para amplificar una región de 0.75-kb de la subunidad α del gen coenzima metil reductasa M (MCR), enzima que distingue a los metanógenos de otros miembros del dominio *Archaea*, la cual es esencial para la síntesis de metano y potencialmente útil como biomarcador para estudios

ecológicos. El ADN fue extraído de dos de las secciones más profundas de un pantano perturbado donde predominan condiciones de anaerobiosis. También demostraron que es posible extraer una buena cantidad de ADN de los tipos de suelo del sitio de estudio. Sin embargo, Tsai y Olsen (1992) determinaron que el pH bajo de las muestras interfiere con la extracción del material húmico, el cual inhibe la actividad enzimática.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Etapas de investigación

3.1.1. Estandarización del Método de Pruebas Metanogénicas

En la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales (PTAR) Dulces Nombres, que está ubicada en el municipio de Pesquería, N.L., a 16 km al NE de Monterrey (Figura 8), formando parte, junto con otras dos plantas de menor tamaño, de un proyecto global de Servicios de Agua y Drenaje de Monterrey, para el suministro de agua (Plan Estatal de Agua Potable y Saneamiento) se realizaron las pruebas metanogénicas de estandarización del método, así como de digestión anaeróbica a nivel de escala.

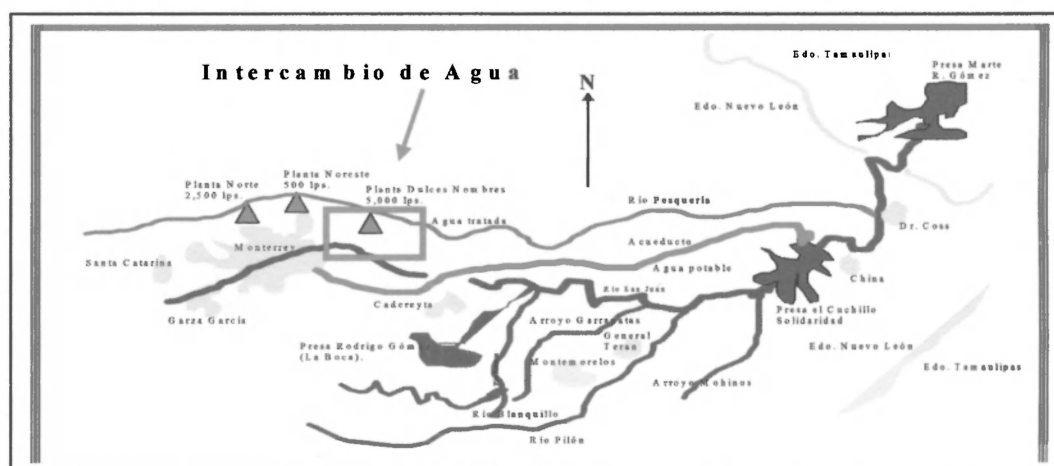


Figura 8. Localización de la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales Dulces Nombres.

La PTAR Dulces Nombres está diseñada para tratar 10,000 lps como máximo de agua residual industrial y municipal a través de lodos activados con aereación por difusión de oxígeno puro. La estabilización de los lodos residuales se lleva a cabo mediante la digestión anaerobia (Figura 9), luego son deshidratados por medio de filtros prensa de bando y finalmente se disponen en un relleno sanitario localizado en la misma planta, que beneficia a una población de 1'800,000 hab.

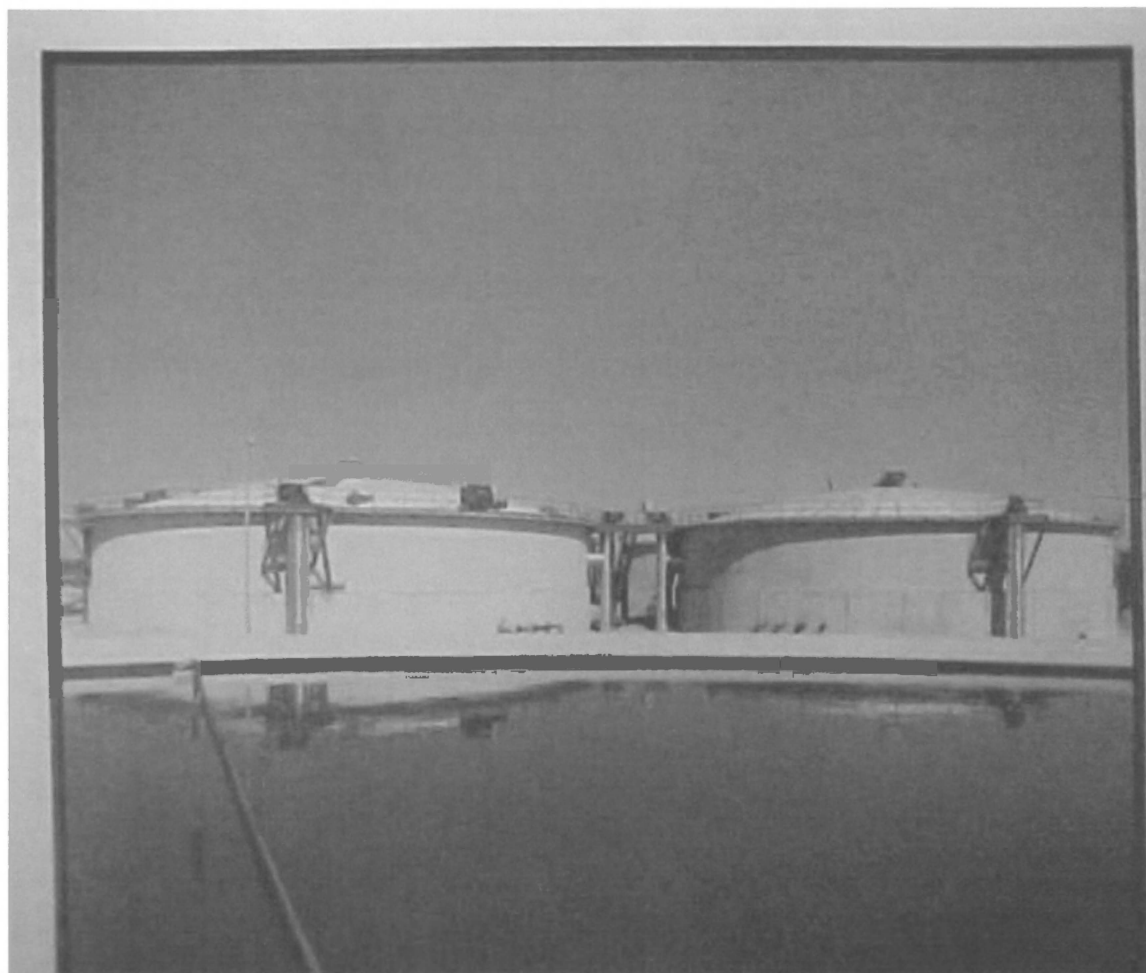


Figura 9. Digestores de la PTAR Dulces Nombres

➤ **Adaptación y Estandarización del Método de Pruebas Metanogénicas**

Esta etapa consistió en determinar las condiciones más adecuadas para que los grupos tróficos tuvieran una mayor eficiencia para producir metano a partir de lodos residuales. Las bases de esta prueba fueron tomadas de Environmental Technology (1995) la cual consistió en una cantidad específica de sustrato (ácido acético) a una cantidad conocida de lodo. Este debe tener un buen contacto con el sustrato, por lo que es indispensable que el sistema cuente con buena agitación; la temperatura a probar, el pH cercano a 7 deben también ser controlados; nutrientes y elementos traza estar disponibles. De esta manera las bacterias metanogénicas empezarán a producir biogas, principalmente compuesto de metano (Figura 10).

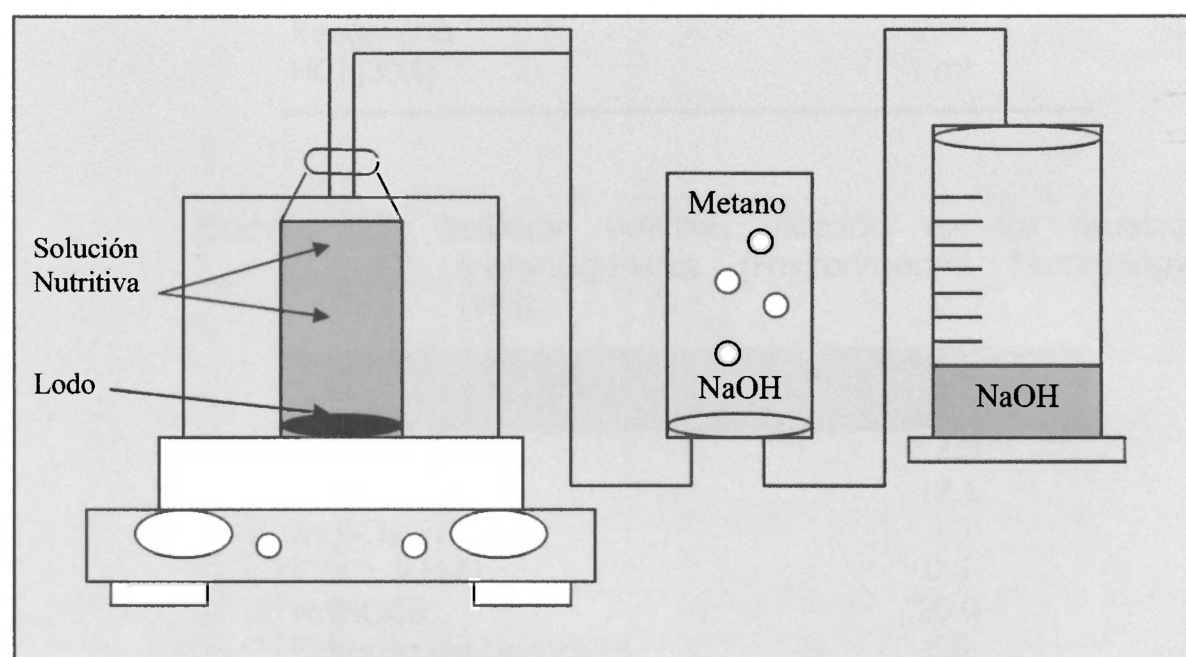


Figura 10. Esquematización de la prueba metanogénica. Adaptado de Ramírez (1994)

➤ **Proceso Experimental de la Prueba Metanogénica**

➤ **Preparación de Soluciones:**

La composición de la solución nutritiva se muestra en los cuadros 8 y 9.

Cuadro 8. Solución de elementos traza utilizada en las pruebas metanogénicas (Environmental Technology, 1995).

Compuesto	Concentración Mg/l
H ₃ BO ₃	50
FeCl ₂ . 4H ₂ O	2000
Zn Cl ₂	50
MnCl ₂ . 4H ₂ O	30
(NH ₄) ₉ Mo ₇ O ₄ . 4H ₂ O	50
AlCl ₃ . 6H ₂ O	90
CoCl ₃ . 6H ₂ O	2000
NiCl ₂ . 6H ₂ O	50
NaSeO ₃ . 5H ₂ O	100
EDTA	1800
Resasurina	200
HCl (30%)	1 ml

Cuadro 9. Solución nutritiva utilizada en las pruebas metanogénicas (Environmental Technology, 1995).

Compuesto	Concentración g/10 l
NH ₄ Cl	14.0
K ₂ HPO ₄	12.5
MgSO ₄ . 7H ₂ O	5.0
CaCl ₂ . 2 H ₂ O	0.5
NaHCO ₃	20.0
Extracto de Levadura	5.0
Solución elementos traza	50.0
Solución de ácido acético*	6.0

*275 g / l de ácido acético neutralizado a un pH 7.0 con NaOH (50%).

➤ **Montaje del Equipo.**

Se utilizaron botellas de suero de un litro de capacidad como cámaras anaeróbicas. A cada una se le agregaron 10 g de lodo granular (con las características mostradas en el Cuadro 10), proveniente de digestores anaeróbicos; 100 ml de solución nutritiva; 6 ml de ácido acético y 400 ml de agua destilada. La composición de la solución nutritiva se detalla en el Cuadro 9 y la de elementos traza en el Cuadro 8.

Cuadro 10. Caracterización de los lodos utilizados en la metanogénesis a diferentes temperaturas.

Temperatura	pH	Sólidos Totales (mg)	Sólidos Volátiles (mg)
36° C	7.0	31205	16690
40° C	7.0	38215	20720
50° C	7.0	24500	11670
60° C	7.0	25130	11920

Una vez hecha la mezcla se aseguró que el pH estuviera cerca de 7 y se colocó la cámara en una plancha de agitación. La temperatura se mantuvo en el medio a 30°C, para lo que se utilizó un baño maría. Cada uno de los frascos se conectó a un bote con solución de NaOH al uno por ciento y se hizo fluir el biogas para atrapar los gases de ácidos generados (H₂S y CO₂). El gas metano acumulado en la parte superior del recipiente con NaOH desplaza al líquido y éste es medido en uno

probeta (Figura 10). Un ml de solución desplazada corresponde a un ml de metano generado.

- Se anotó la fecha y hora del inicio de la prueba, tomándose por lo menos dos lecturas diarias del volumen de la solución de NaOH desplazado. La prueba duró alrededor de una semana, variando el número de días de acuerdo a la actividad de los microorganismos. Al final de la prueba se determinó la cantidad de lodo en el sistema (g de SV). Se graficaron los datos, colocando en el eje X el tiempo y en el Y el volumen del gas metano acumulado para calcular la pendiente Y/X donde se alcanza un valor máximo. La producción máxima de metano ya calculada Y/X se utiliza para determinar la calidad del lodo (AL) usando la fórmula siguiente:

$$AL = \frac{\text{Max. Producción de metano (l/d) (2.53)*}}{\text{Cantidad de lodo (g SV)}}$$

$$= \frac{(Y/X) (24) (2.53)}{\text{Cantidad de lodo (g SV)}}$$

AL = Actividad del lodo en g DQO / g SV.d**

X = Tiempo

Y = Volumen de gas metano acumulado

l/d = Litros por día

* 2.53 es un factor de conversión que depende de la temperatura.

Normalmente un litro de metano producido corresponde a 2.53 g de DQO removida.

**g DQO/ g SV.d = Gramos de Demanda Química de Oxígeno sobre gramos de Sólidos Volátiles por día.

Una vez estandarizada y calibrada la metodología de determinación de la actividad metanogénica, se continuó con el segundo objetivo que fue el de determinar la cantidad y calidad del biogas producido a diferentes temperaturas para lo que fue necesario someter cada muestra de lodo a 36°C (Testigo), 40, 50 y 60 °C.

➤ **Análisis Estadístico**

Los tratamientos a probar fueron: 36° C (Testigo), 40, 50 y 60° C, repitiéndose cada uno tres veces, evaluando la cantidad de biogas producido (ml promedio), actividad metanogénica, utilizando el Análisis de Varianza (ANVA) con un modelo de dos factores sin interacción, siendo la variable dependiente el volumen de biogas producido y las independientes, temperaturas y días; calidad del biogas (ppm de H₂S) y coliformes totales en número más probable NMP para la del lodo.

➤ **Volumen de Biogas Producido**

Para evaluar este parámetro se utilizó la técnica de la prueba propuesta por Environmental Technology (1995) donde cada muestra se sometió a los tratamientos mencionados, durante un período aproximado de una semana, realizándose mínimo dos observaciones diarias y calculándose el promedio del biogas producido por día para obtener la máxima actividad de lodo por tratamiento (Figura 11).

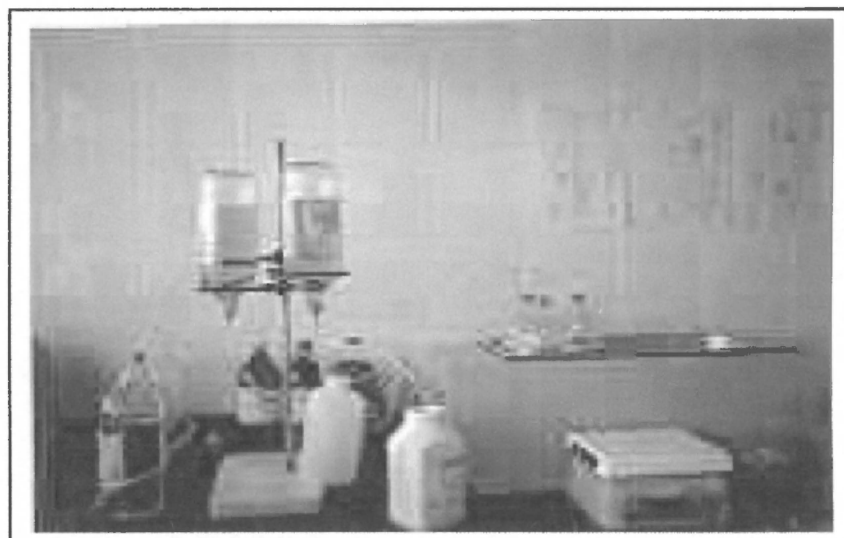


Figura 11 . Pruebas metanogénicas de los diferentes tratamientos.

Calidad del Biogas

Para determinar la calidad del biogas se midió la concentración de H_2S con un sensor específico para el medidor. Se repitió la prueba de actividad metanogénica solamente que se aumentó tres veces las proporciones del lodo y de la solución nutritiva con el propósito de aumentar el volumen del biogas producido y poder detectar el H_2S con el electrodo específico que tiene un rango entre 0.25-2.5 ppm (Figura 12) y va conectado al medidor de H_2S marca GASTEC/SENSIDYNE modelo GV 100S serie 7013113-2 (Figura 13) que es colocado a la salida del digestor.

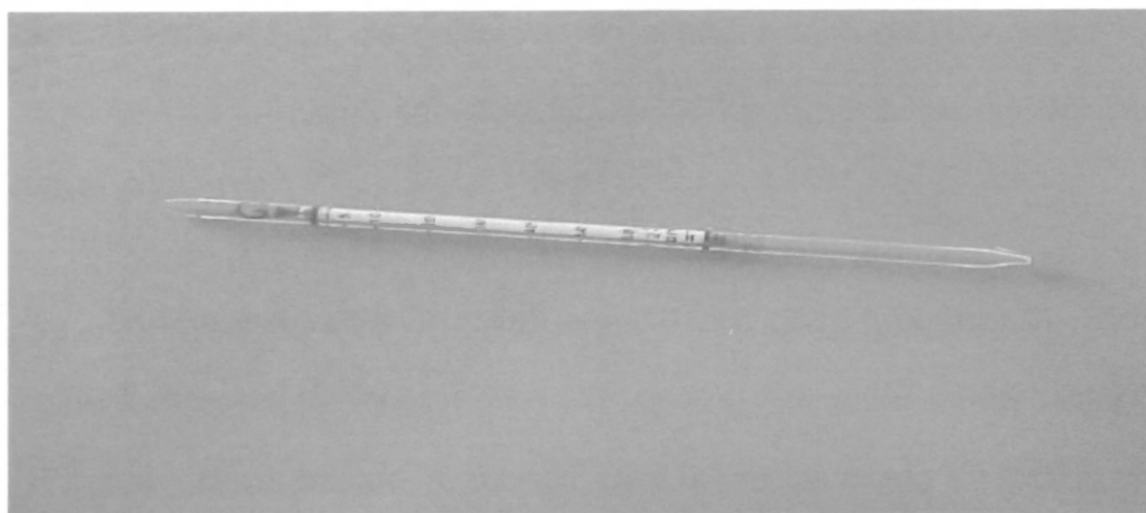


Figura 12. Sensor de medición de la concentración de H_2S . (0.25-2.5 ppm).



Figura 13. Medición del H_2S contenido en el biogas (medidor marca GASTEC/SENSIDYNE Modelo GV 100S Serie 7013113-2).

➤ Calidad del Lodo

La calidad del lodo se evaluó en función del NMP de coliformes. Después de terminada la prueba de Metanogénesis se tomó una muestra del lodo digerido de cada uno de los tratamientos para

determinarle el NMP de coliformes en el Laboratorio de Tecnología de Alimentos de la misma Facultad, siguiendo las técnicas reportadas por Parilla *et al.* (1987):

Prueba presuntiva. Se transfirieron 10 ml a cinco tubos con 20 ml de caldo lactosado (fórmula marca DISCO-USA) de doble concentración (19.5 g/l) y dos tubos de 10 ml con 1.0 y 0.1 ml de caldo lactosado de concentración sencilla (13.0 g/l); se incubaron a 35° C durante un período de 24 a 48 hr para observar si había o no formación de gas y en caso de que fuera positiva se continuó con el siguiente paso.

Prueba confirmativa. Los frascos que presentaron formación de gas se agitaron y se transfirió un inóculo de cada uno de ellos a un tubo con caldo verde brillante bilis (fórmula marca DISCO-USA) para incubarlo a 35° C durante 24 hr y en caso de formación de gas se considera una prueba confirmativa positiva (Figura 14).

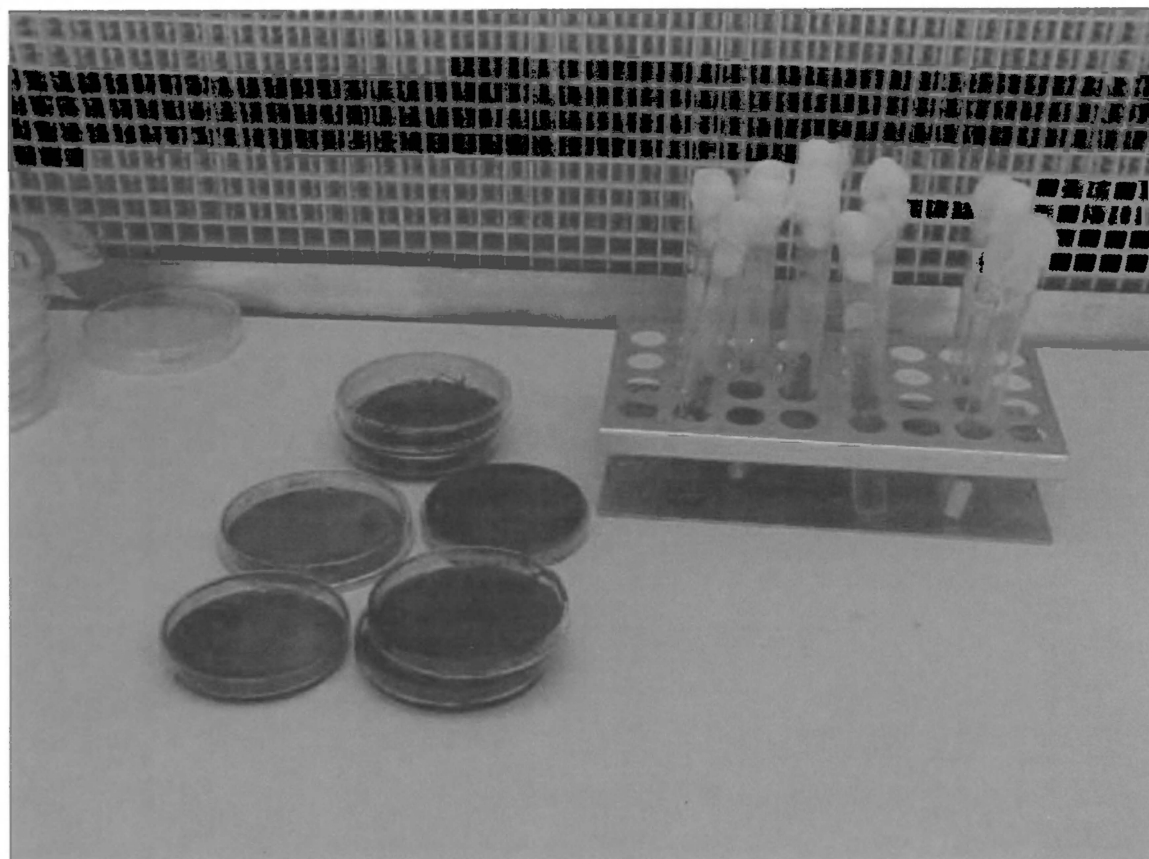


Figura 14. Cuantificación del Número más probable (NMP).

3.1.2. Detección de Bacterias Metanogénicas

Se realizó en el Laboratorio de Genética de la Facultad de Agronomía de la Universidad Autónoma de Nuevo León. El propósito fue detectar la presencia de bacterias metanogénicas en los lodos de un digestor de la PTAR Dulces Nombres, para lo cual el lodo fue digerido a 57°C en un digestor a escala (Figura 15), por un período de un mes. Posteriormente se tomó una muestra representativa de 50 ml de lodo

para la extracción de ácidos nucleicos y la amplificación parcial del genoma bacteriano por PCR.

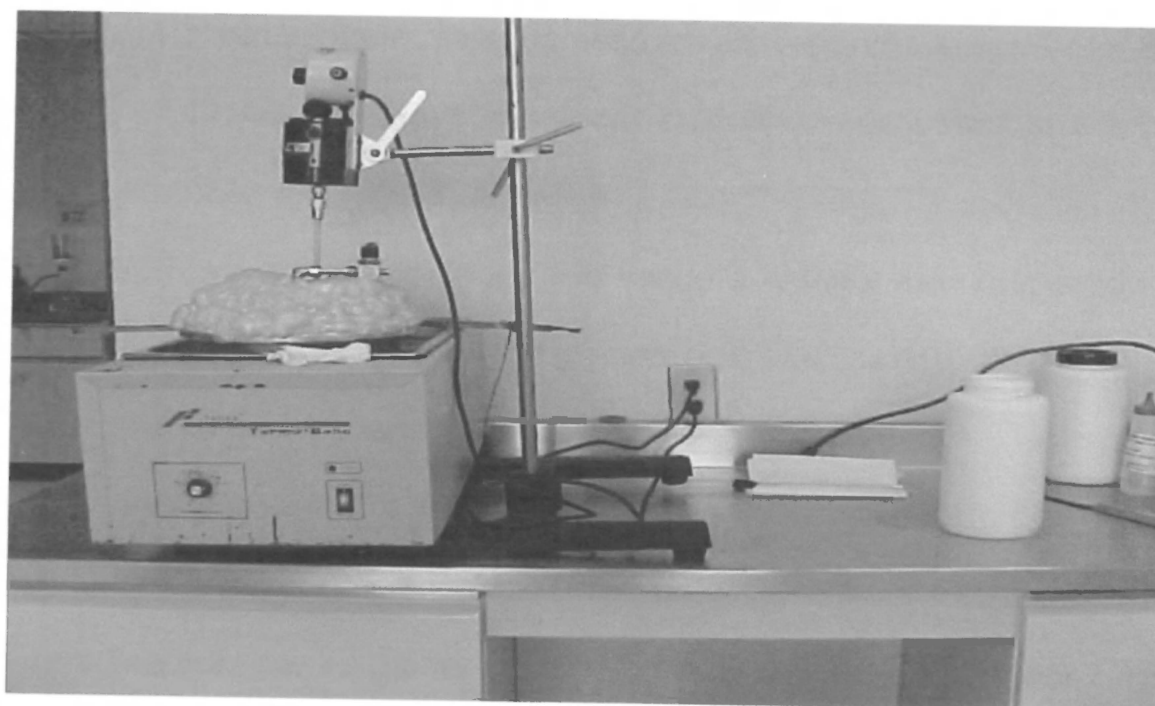


Figura 15. Digestión anaeróbica de lodo primario a 57° C.

Lisis celular y extracción de ADN. Para la extracción de ADN de la muestra del lodo colectado se siguió el procedimiento de De Lamballerie et al. (1992) con tres modificaciones en la fuerza de centrifugación utilizada, como se describe a continuación: una muestra inicial de lodo de 1.5 ml se centrifugó a 3000 rpm durante 8 min con el propósito de eliminar el lodo más denso.

1. El sobrenadante (1.5 ml) se sometió a 10,000 rpm durante 6 min desechándose el decantado y utilizándose la pastilla resultante.

2. El sobrenadante de la muestra inicial (1.5 ml) se sometió a centrifugación de 10,000 rpm por 3 minutos; se recuperó el sobrenadante y se sometió a un segundo tratamiento de 10,000 rpm por 5 min, para posteriormente utilizar la pastilla obtenida.
3. El sobrenadante final de la variante anterior fue recuperado y sometido a otra centrifugación adicional de 10,000 rpm por 5 min para obtener una pastilla más fina.

Todas las pastillas fueron sometidas a un doble lavado con 300 μ l de solución salina amortiguadora de fosfatos (estéril), 0.05 M, pH 7.4 y se centrifugaron dos ocasiones a 10000 rpm por 3 minutos una y por 2 min otra. Las pastillas celulares resultantes fueron almacenadas a -20°C hasta ser usadas en las reacciones de PCR.

Para resuspender las células se les agregó 300 μ l de la solución de lisis, se colocaron en baño María (aprox. 95°C) por 15 min. Posteriormente las muestras fueron sometidas a centrifugación (10,000 rpm) por 10 min y el sobrenadante fue utilizado para las reacciones de PCR. La solución de lisis celular fue elaborada con Chelex 100 al 20 por ciento (p/v) (malla de 50-100, Sigma-Aldrich Química), suspendido en una solución acuosa de dodecil sulfato de sodio (SDS) al 0.1 por ciento (v/v) y Tween-20 al 1 por ciento (v/v), esterilizando la solución final

durante 15 minutos. La efectividad de las tres variantes de centrifugación fue evaluada por su capacidad de amplificación por PCR de los ADN obtenidos y fue repetido en tres ocasiones.

➤ **Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

- **Selección de iniciadores (primers).** Para la amplificación de una parte del genoma bacteriano presente en los lodos primarios digeridos se seleccionaron los primers reportados por Daffonchio *et al.* (1998) identificados como M_{bac}-derecho con secuencia: **5'-CTGTCTCAGGTCCATCTCGC-3'** y el M_{bac}-izquierdo: **5'-CCGTTGATCCTGGCGGAGG-3'** que amplifican un fragmento de 300 pares de bases (pb) aproximadamente del ADN_r 16S de bacterias metanogénicas. También se utilizaron los primers reportados por Hales *et al.* (1996) identificados como ME1 y ME2 cuyas secuencias **5'-GCMATGCGATHGGWATGTC-3'** y **5'-TCATKGCRTAGTIDGGRTAG-3'**, respectivamente, fueron diseñados para amplificar una región de 800 pares de bases (pb) de la subunidad α del gen de la coenzima metil reductasa M (MCR), específica de metanógenos.

Con los dos juegos de primers antes referidos y algunas secuencias molde del género *Methanobacterium* obtenidas vía electrónica (INTERNET) del GenBank del Centro Nacional de Información Biotecnológica de los Estados Unidos de Norteamérica (www.ncbi.nlm.nih.gov), se realizó una simulación computacional

utilizando el programa Amplify versión 1.2 (Engels, 1993), para observar el comportamiento esperado de los primers y una vez verificada su utilidad se elaboraron en la compañía BioSynthesis, Inc. (Lewisville, Tx. U.S.A.).

- **Amplificación del ADN.** Todas las reacciones se hicieron en un volumen final de 25 μ l, en tubos de centrifuga de 200 μ l agregando los siguientes componentes:

SOLUCIÓN	CONCENTRACIÓN FINAL
Solución amortiguadora de 10X	1X
Mg Cl ₂ 25 mM	1 mM
mezcla de dNTP's (2.5 mM) (Promega)	200 μ M
Taq DNA polimerasa (Promega) 5 U/ μ l	2.5 U
ADN molde	2, 4, 6 y 8 μ l
primer derecho 2.5 μ M	800 nM
primer izquierdo 2.5 μ M	800 nM
agua grado Mili – Q	Completar a 25 μ l

Los tubos fueron colocados en un termociclador Blorad (Figura 16), con el programa térmico siguiente:

94° C	1 minuto (una vez)
94° – 50° – 72° C	1 – 1 – 1 minutos (34 veces)
72° C	4 minutos (una vez)

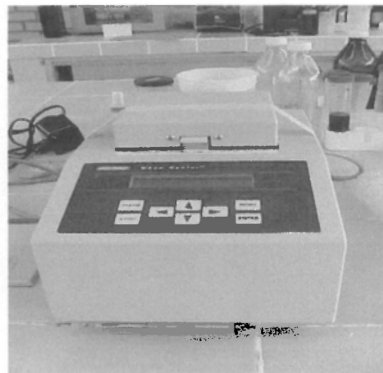


Figura 16. Vista del termociclador Blorad utilizado para la amplificación del ADN bacteriano.

▪ **Electroforesis y visualización de productos de PCR.** Una alícuota de 6 μ l producto de la PCR fueron cargados en un gel de agarosa (Sigma) al 1.5 por ciento mezclándose con los colorantes de azul de bromofenol (0.3%) y xilencianol (0.3%) utilizándose solución de TBE 0.5X (Tris-HCl 45 mM, ácido bórico 45 mM y EDTA 1 mM) como solvente de la agarosa y como solución amortiguadora de corrimiento (Sambrook *et al.*, 1989). El gel fue teñido con 20 μ l de bromuro de etidio. Se utilizó una cámara de electroforesis (Gibco BRL, modelo Horizon 58) con un corrimiento por 5 min a 64 V y 40 min adicionales a 100V (Figura 17).



Figura 17. Cámara de Electroforesis (Gibco BRL, modelo Horizon 58) utilizada para la separación de productos de PCR.

Después de la separación de ADN por electroforesis, los productos amplificados fueron visualizados en un transiluminador de luz ultravioleta (UVP modelo.TM-10) y fotografiados con una cámara Polaroid instantánea blanco y negro con película 667.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Calibración y Estandarización de las Pruebas Metanogénicas.

Para realizar las pruebas metanogénicas se utilizaron los principios descritos por Environmental Technology (1995), adaptándolas a las condiciones y materiales disponibles, logrando obtener un proceso de digestión del lodo y captura del biogas adecuados.

Las pruebas se repitieron varias veces a 30°C, con la finalidad de determinar las longitudes de los tubos de vidrio de la entrada del biogas al frasco de sosa y la salida de ésta hacia la probeta de recolección, encontrando el óptimo en 15 cm de largo por 5 cm de altura; la diferencia en la altura entre ambos fue de 1 cm, correspondiendo menor altura a la salida. El recipiente de sosa se colocó a más altura que el bote con lodo y solución nutritiva (Figura 10).

4.1.1. Volumen de biogas producido

La actividad de las bacterias metanogénicas se midió con la técnica descrita en el Capítulo de Materiales y Métodos, utilizando tres

repeticiones para cada uno de los cuatro tratamientos y las medidas del volumen del biogas generado se tomaron dos veces al día durante 5 ó 6 días.

Cada una de las repeticiones estuvo conectada con una probeta. Se encontró variabilidad en el volumen de sosa recuperada (biogas producido) entre las probetas, independientemente de los tratamientos (Cuadro 1 a 4 del Apéndice). En la repetición III (Probeta 3) fue donde se tuvo la mayor variabilidad, no encontrando en varios de los días estudiados recuperación de sosa. Debido a estos inconvenientes experimentales se utilizaron para su análisis, únicamente los datos de la repetición II, considerando un modelo con dos factores sin interacción en donde la variable dependiente fue el volumen de biogas producido y las independientes, temperaturas y días. Después de un cierto período, generalmente entre 12 y 48 hr, la producción de gas se estabiliza en un valor máximo.

Los resultados del ANVA (Análisis de Varianza, Cuadro 11) mostraron que no hubo diferencia significativa entre los tratamientos en ninguna de las variables estudiadas (recuperación en la mañana, en la tarde y total); sin embargo se observó una tendencia que muestra que a medida que se incrementa la temperatura disminuye la actividad de las bacterias metanogénicas. En cuanto a los litros de biogas producido fue

mayor en el tratamiento de 36° C (Cuadro 12), donde puede observarse que la mayor eficiencia metanogénica (g de DQO removida por día) se logró a los 50° C debido a que la muestra utilizada contenía un valor menor de sólidos volátiles, así como la Figura 1 del Apéndice de las que se tomó la pendiente de cada tratamiento para determinar la actividad del lodo.

Cuadro 11. Análisis de Varianza (ANVA) de la repetición II. Pruebas de efectos entre variables.

Fuente de Variación	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrado Medio	F	Sig
Tratamiento	281438.133	3	93812.711	2.982	0.070
Día	305954.517	5	61190.903	1.945	0.155
Error	409017.117	13	31462.855		
Total:	4134665.00	22			
Total Corregido	931663.864	21			

Los resultados logrados a 36°C, en cuanto a DQO removida tienen un comportamiento más cercano al de 50°C, atribuyéndolo a que son muestras anacrónicas, lo que se relaciona con la variación en la calidad de lodo y del biogas producido.

Cuadro 12. Volumen Acumulado de Biogas Producido (l) y eficiencia de las pruebas metanogénicas (g.DQO.d) por tratamiento a los 7 días.

Tratamiento	Volumen Acumulado (L)	Promedio Biogas Producido (L)	AL (g.DQO.d)	Sólidos Volátiles (g)
36° C	5.545	1136.683	4.42	16.69
40° C	4.990	831.667	2.47	20.72
50° C	5.919	986.500	5.29	11.67
60° C	3.444	916.483	2.87	11.92

4.1.2. Calidad del Biogas

- **Contenido de H₂S.** En cuanto al contenido de cada tratamiento fue menor de 0.25 ppm, clasificándose como de buena calidad para la generación de energía.

4.1.3. Calidad del Lodo

- **NMP.** Los resultados obtenidos en los diferentes tratamientos, en lo que a coliformes se refiere, sólo se observaron a 50° C un NMP menor 240, lo que los clasifica como buenos, por lo que se le realizó la prueba confirmativa, resultando negativa. Estos datos coinciden con los reportados por Plachy *et al.* (1997).

4.2. Detección de Bacterias Metanogénicas

De acuerdo con la simulación computacional realizada aplicando el programa Amplify versión 1.2 se verificó que los primers seleccionados se adhieren al ADN específico de bacterias metanogénicas con un 100 por ciento de afinidad lo que favorece la amplificación específica de las secuencias de interés, reduciendo la probabilidad de amplificación inespecífica del ADN de otras bacterias (figuras 18 y 19).

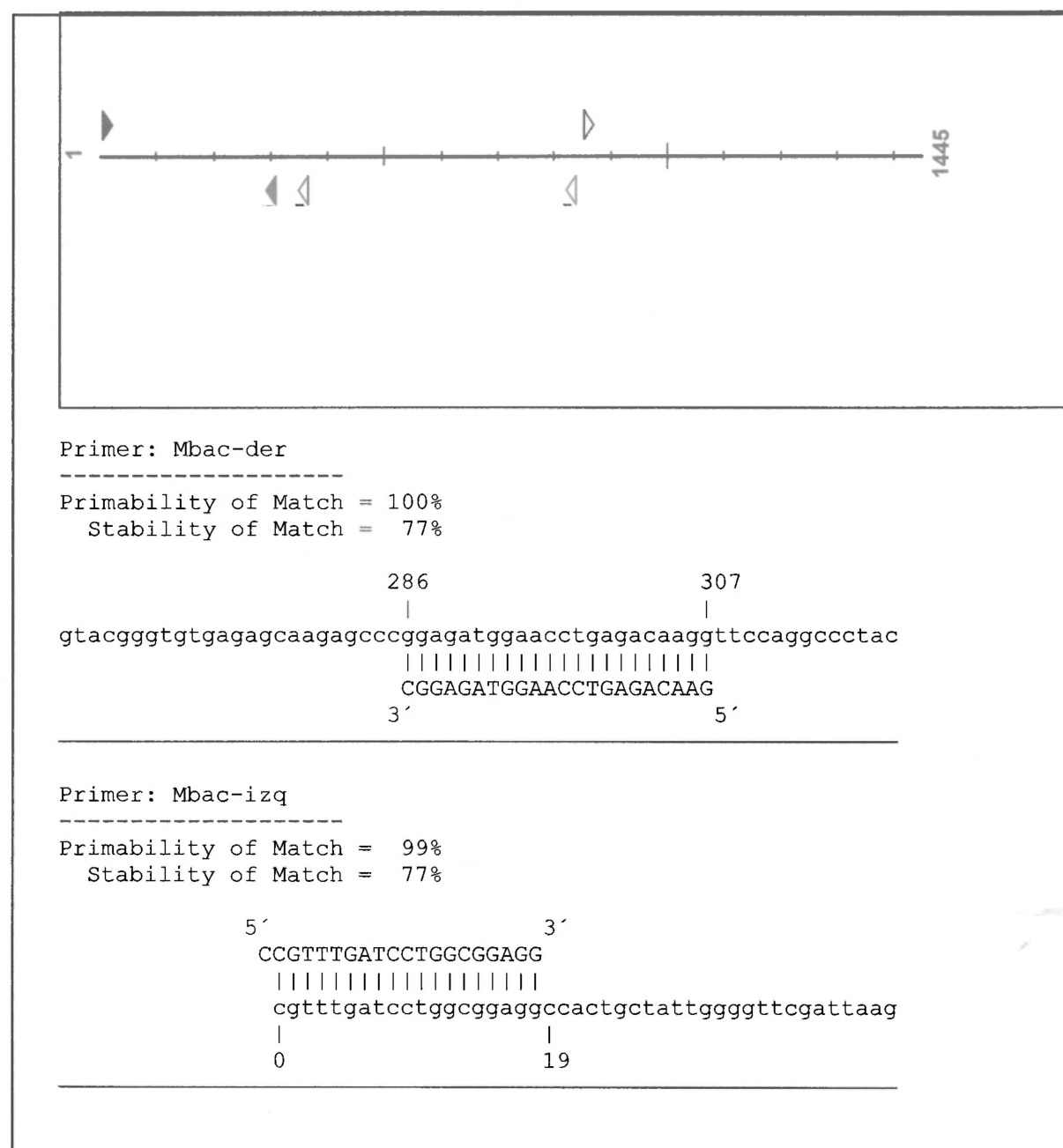


Figura 18. Simulación de amplificación por PCR del gen ARNr 16S a partir de la secuencia AF028690 de *Methanobacterium* sp. y los primers Mbac-izq y Mbac-der.

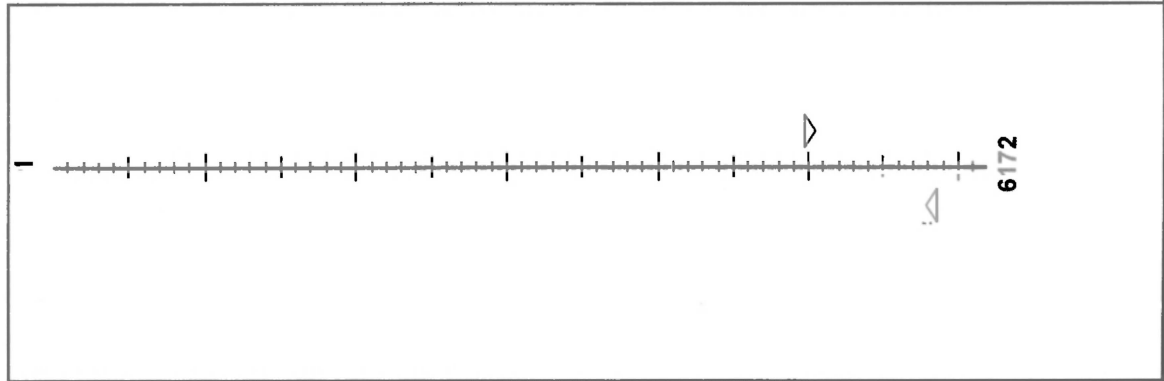


Figura 19. Simulación de amplificación por PCR del gen *mrc* (metil CoM reductasa) a partir de la secuencia de *M. Thermoautotrophicum* y los primers degenerados ME1 y ME2.

Después de probar diferentes fuerzas de centrifugación para la extracción de ADN y diluciones del templado para su uso en PCR, la variante dos, descrita en el Capítulo de Materiales y Métodos, fue la mejor técnica de extracción, lográndose la amplificación de un fragmento de 310 pb aproximadamente específico de secuencias conservadas en bacterias metanogénicas del ADNr 16S; además del otro fragmento del gen que codifica para la subunidad α de la coenzima metil reductasa M (mcr) con una talla de 762 pb aproximadamente (Figura 20). Analizando los fragmentos amplificados se observa que las tallas moleculares obtenidas coinciden con las esperadas de acuerdo con la simulación computacional de PCR realizada con el programa Amplify, entre las secuencias molde y los iniciadores utilizados en el presente trabajo. Lo anterior asegura que en el ADN obtenido a partir de la lisis bacteriana, procede de bacterias metanogénicas. Cabe señalar que la misma prueba fue repetida en tres muestreos espaciados en tiempo, con los mismos resultados.

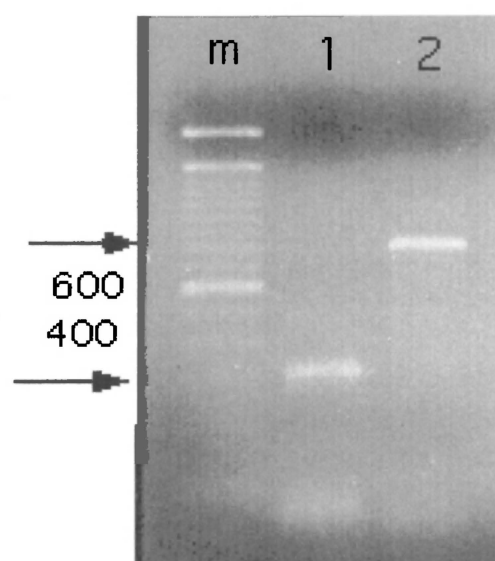


Figura 20. Amplificación enzimática de los genes ARNr 16S (carril 1) y la subunidad α del gen de la coenzima metil reductasa M (carril 2) de bacterias metanogénicas presentes en lodos de una Planta de Tratamiento de Aguas Residuales. m es el marcador de peso molecular escalera 100, y las flechas indican los productos obtenidos de 310 y 762 pb aproximadamente.

V. CONCLUSIONES

- Se logró la calibración y estandarización del método de pruebas metanogénicas basadas en las técnicas de Environmental Technology (1995).
- El tratamiento a 36°C produjo el mayor volumen de biogas y de actividad de lodo, conteniendo menor cantidad de sólidos volátiles (SV) con respecto al tratamiento de 60°C.
- La calidad del biogas, en cuanto al contenido de H₂S, fue menor de 0.25 ppm para todos los tratamientos, clasificándose como de buena calidad para la generación de energía.
- La calidad del lodo, en lo que respecta a coliformes, sólo en el tratamiento de 50°C se presentó el NMP menor de 240, por lo que se les realizó la prueba confirmativa que resultó negativa, lo que los clasifica como buenos.
- El método de extracción de ácidos nucleicos de De Lamballerie et al. (1992) modificado, resultó ser efectivo para la extracción de ADN en bacterias metanogénicas presentes en lodos residuales.
- La técnica de PCR resultó ser rápida y precisa para la detección de bacterias metanogénicas termofílicas, teniendo la ventaja de

que para su aplicación no se requiere aislamientos anaeróbicos en condiciones específicas.

VI. LITERATURA CITADA

- Almeyda L., H. 1996. Diagnóstico Molecular de enfermedades. Reacción en Cadena de la Polimerasa. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN. Irapuato, Gto. Mex. Notas de curso mimeo. p 54 -58.
- CYDSA-ATLATEC. 1995. Estabilización de Lodos Biológicos. Manual de Tecnología de Procesos, Programa de Calidad, División de Mejoramiento Ambiental, Monterrey, N.L. Mx. 94 pp.
- Daffonchio, D., A. De Biase, A. Rizzi and C. Sorlini. 1998. Interspecific, intraspecific and interoperonic variability in the 16S rRNA gene of methanogens revealed by length and single-strand conformation polymorphism analysis. FEMS Microbiology Letters 164; 403-410.
- De Lamballerie, X., C. Zandotti, C. Vignoli, C. Bollet, and P. De Micco, 1992. A one-step microbial DNA extraction method using 'Chelex 100' suitable for gene amplification. Res. Microbiol. 143; 785-790.
- Engels, B. 1993. Amplify. Version 1.2. For analyzing PCR experiments. University of Wisconsin, Madison, WI.
- Environmental Canada- Environmental Protect Service (EPS). 1984. Manual for land application of treated municipal wastewater and sludge. Manual EPS 6-EP-84-1-, Environemental Protection Programs directorate. Minister of.
- Environmental Technology. 1995. Biological Activity Test Unit. Unit Description and Test Procedure. Paques, Inc. Exxtion, Pa. USA, 9 pp.
- Fang, H.H.P. and H.H. Hui. 1994. Effect of heavy metals on the methanogenic activity of starch-degrading granulates. Biotechnology Letters. 16;1091-1096.

- Gamrasni, M.A. 1985. Aprovechamiento Agrícola de Aguas Negras Urbanas. Asociación Francesa para el estudio de las aguas. Ed. Limusa. México. pp137.
- Hales, A.B., E. Clive, D.A. Ritchie, G. Hall, R.W. Pickup and J.R. Sawnders. 1996. Isolation and identification of methanogen – specific DNA from blanket bog peat by PCR amplification and sequence analysis. *Applied and Environmental Microbiology*. p. 668-675.
- Henson, J.M. and R. French. 1993. The polymerase chain reaction and plant disease diagnosis. *Ann. Rev. Phytopathol.* 31:81-109.
- Higgins, I.J. and R.G. Burns. 1975. *The Chemistry and Microbiology of pollution*. Academic. Londres.
- Holland, K.T., J.S. Knapp and J.G. Shoesmith. 1987. *Anerobic Bacteria*, Chapman and Hall, New York.
- Innis, M.A., D.H. Gelland, J.J. Sninsky and T. J. White. 1990. *PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications*. Academic Press. Inc. pp 3-11.
- Instituto Mexicano de Tecnología del Agua. (IMTA). 1993. *Tratamiento Anaeróbico de Aguas Residuales*. Instituto de Ingeniería UNAM. Mx. 297 pp.
- Kroeker, E.J. 1979. Anaerobic Treatment Process Stability. *Journal of Water Pollution Control Federation*. Vol. 51. N° 4.
- Martínez-Soriano, J.P. 2000. *Perspectivas de la Biología Molecular en el diagnóstico fitosanitario en México y Diseño de primers para PCR. Memorias del curso: Detección e identificación de fitopatógenos de importancia cuarentenario mediante técnicas moleculares*. México, D.F. pp-10.
- Mason, C.A., A. Haner and G. Hamer. 1992. Aerobic thermophilic waste sludge treatment. *Water-Science and Technology*. Inst. Of Aquatic Sciences and Water Pollution Control, Dubendorf, Switzerland. 25:1, 113-118.
- Mc Carty, P.L. 1964. *Anerobic Waste Treatment Fundamentals*. Public Works. Vol. 95. Num. 8-12.

- _____. 1966. Kinetics of Waste Assimilation in Anaerobic Treatment, Developments in Industrial Microbiology. Vol. 7. American Institute of Biological Sciences, Washington, D.C.
- Menéndez, G.C. y J. Pérez. 1991. Procesos para el Tratamiento Biológico de Aguas Residuales Industriales. Cd. De la Habana, Cuba. 311 pp.
- Metcalf & Eddy, Inc. 1997. Ingeniería Aguas Residuales. Tratamiento vertido y reutilización. Ed. MCGraw Hill. Mx. 752 pp.
- Mosey, F.E. 1983. Kinetic descriptions of anaerobic digestion. In: thirth International Symposium on Anaerobic Digestion, USA. pp 37-53.
- Nicholson, 1991. Sludge, too beneficial to waste. Keynotes, Water Environmental & Technology , Water Pollution Control Federation. 3:12:67
- Nölling, J., D.Hahn, W. Ludwig and W.M. de Vos. 1993. Phylogenetic analysis of thermophilic *Methanobacterium* sp. : evidence of a formate – utilizing ancestor. Syst. Appl. Microbiol. 16. 208-215.
- Parilla, C. M. C; E.O. Saldate y L.M. Nicoli. 1987. Manual de técnicas y procedimientos de laboratorio para análisis microbiológico de agua potable. Secretaría de Salud. Subsecretaría de Servicios de Salud. Dirección General de Epidemiología. Laboratorio Nacional de Salud Pública. México, D.F.
- Plachy, P., I. Placha and P. Juris. 1997. Effect of anaerobic stabilization of sewage sludges on the survival of *Ascaris suum* under laboratory conditions. Parasitological Inst. Kosice, Slovakia. Helmintologia 34:4, 229-234.
- Prescott, L.M., J.P. Harley y D.A. Klein. 2000. Microbiología. Cuarta Edición. Mc Graw-Hill. Interamericana de España. S.A.U. p 437-453.
- Ramírez, A. 1994. Tratamiento de Aguas Industriales. Facultad de Ciencias Químicas. U.A.C., Saltillo, Coah. México. 130 p.
- Reeve, J.N. 1992. Molecular biology of methanogens. Ann. Rev. Microbiology 46:165-191.

Sambrook, N., E.F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. N.Y.

Seoanez, C.M. 1995. *Aguas Residuales Urbanas. Tratamientos Naturales de Bajo Costo y Aprovechamiento*. Colección Ingeniería Medioambiental. Ed. Mundi-Prensa. Madrid, España. p 363.

Silva-Rosales, L., O. G. Alvarado y J.P. Martínez. 1999. La Reacción en Cadena de la Polimerasa como herramienta de diagnóstico en virología vegetal. *Fitopatología* 34:13-21 p.

Speece, R.E. 1983. Anaerobic Biotechnology for Industrial Wastewater treatment. *JWPCF*, 37 (1) : 416-427.

Speece, R.E. and P.L. Mc Carty. 1964. Nutrient requirements and biological solids accumulation in anaerobic digestion. *Adv. Wat. Pollut. Res. Proc. of the International Conference of water pollution research*. (2) : 305-3-22.

Stronach, S.M., T. Rudd and J.N. Lester. 1986. *Anaerobic digestion Processes in Industrial Wastewater Treatment*. Ed. Springer-Verlag, New York.

Torres, G.G. y V.R. Zárate. 1996. Estudio técnico sobre la factibilidad de tratamiento, manejo y disposición de los lodos residuales de la planta de tratamiento. *Agua Industrial de Monterrey, S. de U., Monterrey, N.L., Abril*. 182 pp.

Tsai, Y.L. and B.H. Olsen. 1992. Detection of low numbers of bacterial cells in soils and sediments by polymerase chain reaction. *Appl. Environm. Microbiol.* 58 :754-757.

U.S. Environmental Protection Agency. 1983. *Land Application of municipal sludge. Process design manual* U.S. EPA Center for Environmental Research Information. Cincinnati, Ohio.

Water Environment Federation (WEF). 1996. *Operation of Municipal Wastewater Treatment Plants. Manual of Practice-Mop 11*. Volume 3. Alexandria, Va. USA. p 965-1351.

Water Environment Federation (WEF). 1997. *Aerobic and Anaerobic thermophilic digestion. Biosolids Technical Bulletin*. Vol 3. Nº 5, Sept-Oct USA. pp 58.

Water and Wastewater Training Division (WWTD). 2000. Operaciones Básicas para el Tratamiento de Aguas Residuales. Texas Engineering Extension Service. The Texas A&M. University System. College Station. Texas, USA. Cap. 12. p 1-19.

VII. A P E N D I C E

Cuadro 1. Tratamiento 36°

Días	Repetición	Lecturas (I)		I Acumulados
1	I	0.565	0.200	0.765
	II	0.560	0.225	0.785
	III	0.050	0.055	0.105
2	I	0.675	0.100	0.765
	II	0.715	0.450	1.165
	III	0.150	0.180	0.330
3	I	0.680	0.380	1.060
	II	0.690	0.600	1.290
	III	0.510	0.370	0.880
4	I	0.550	0.310	0.860
	II	0.680	0.660	1.340
	III	0.090	0.440	0.530
5	I	0.650	0.190	0.840
	II	0.660	0.305	0.965
	III	0.700	0.055	0.755

Cuadro 2. Tratamiento 40°

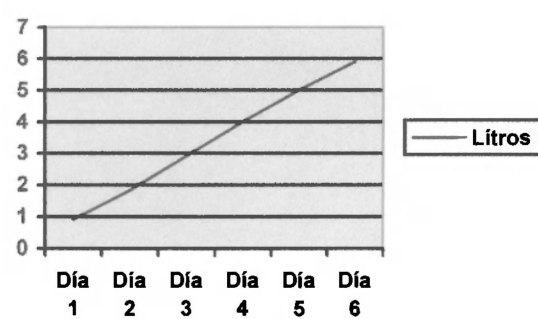
Días	Repetición	Lecturas (I)		I Acumulados
1	I	0.620	0.160	0.780
	II	0.650	0.165	0.815
	III	0.640	0	0.640
2	I	0.390	0	0.390
	II	0.245	0.135	0.380
	III	0.045	0	0.045
3	I	0.075	0.235	0.235
	II	0.755	0.160	0.915
	III	0.070	0	0.070
4	I	0.360	0.050	0.410
	II	0.640	0.150	0.790
	III	0.030	0	0.030
5	I	0.210	0.150	0.360
	II	0.710	0.200	0.910
	III	0	0	0
6	I	0.570	0.325	0.895
	II	0.740	0.480	1.180
	III	0.710	0.080	0.790

Cuadro 3. Tratamiento 50°

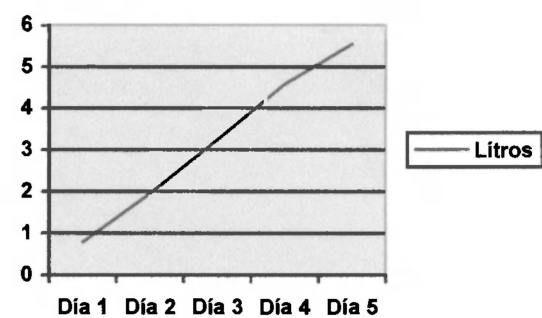
Días	Repetición	Lecturas (l)		l Acumulados
1	I	0.650	0.235	0.885
	II	0.630	0.295	0.925
	III	0.170	0.235	0.405
2	I	0.165	0.330	0.495
	II	0.825	0.078	0.903
	III	0.110	0.048	0.158
3	I	0.414	0.472	0.886
	II	0.364	0.718	1.082
	III	0.162	0.112	0.274
4	I	0.498	0.468	0.966
	II	0.596	0.504	1.100
	III	0.480	0.300	0.780
5	I	0.398	0.470	0.868
	II	0.330	0.664	0.994
	III	0.404	0.464	0.868
6	I	0.342	0.392	0.734
	II	0.295	0.620	0.915
	III	0.214	0.112	0.356

Cuadro 4. Tratamiento 60°

Días	Repetición	Lecturas (l)		l Acumulados
1	I	0.154	0.148	0.302
	II	0.350	0.092	0.442
	III	0.130	0.098	0.228
2	I	0.322	0.066	0.388
	II	0.398	0.534	0.932
	III	0.448	0.310	0.758
3	I	0.098	0.440	0.538
	II	0.475	0.350	0.825
	III	0.558	0.060	0.618
4	I	0.066	0.108	0.174
	II	0.750	0.320	1.070
	III	0.572	0.210	0.782
5	I	0.052	0	0.052
	II	0.525	0.650	1.175
	III	0.486	0.460	0.946

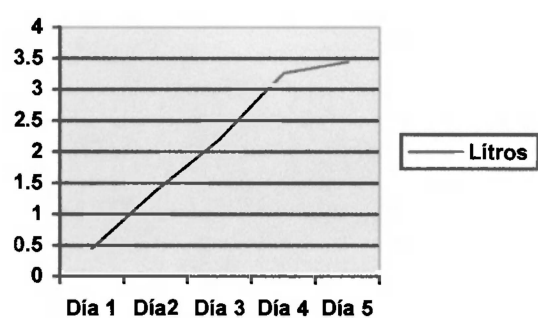


$$b1 = 0.843143$$

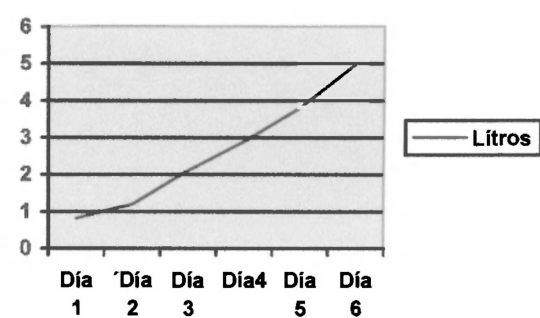


$$(a) \quad b1 = 1.215000$$

(b)



$$(c) \quad b1 = 1.017129$$



$$(d) \quad b1 = 0.789900$$

Figura 1. Producción de Metano (en L) a 36°C (a), 40°C (b), 50°C (c) y 60°C (d).